

N° d'ordre:

THESE

Présentée
En vue de l'obtention du
Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse

Spécialité: Génétique et Biotechnologie Végétal

Par

Reza Darvishzadeh

Déterminisme Génétique de la Résistance du Tournesol au Phoma

Soutenue le 2 Mai 2007 devant le jury composé de :

M. Y. Henry	Directeur de Recherche, Université Paris-Sud	Rapporteur
Mme. F. Vear	Directeur de Recherche, INRA de Clermont-F ^d	Rapporteur
M. G. Dechamp-Guillaume	Professeur INP/ENSAT, Toulouse	Examineur
Mme. E. Mestries	Ingénieur CETIOM, Grignon	Examineur
M. A. Sarrafi	Professeur INP/ENSAT, Toulouse	Directeur de thèse

*Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse- Laboratoire de Biotechnologie
Amélioration des Plantes- 18 Chemin de Borde Rouge, BP 32607, 31326 - Castanet-Tolosan*

REMERCIEMENTS

Cette thèse a été réalisée dans le cadre d'une bourse accordée par le Ministère de l'Education Nationale et de la Recherche en Iran. J'exprime ici mes remerciements pour le financement de mes études en France ainsi qu' au service de l'Education de l'Ambassade d' Iran en France.

Je tiens à exprimer ma gratitude à mon responsable de thèse, Monsieur le Professeur SARRAFI, pour la confiance qu'il m'a témoignée en me proposant ce sujet, pour ses précieux conseils et sa grande disponibilité. Ces quelques années ont été pour moi très enrichissantes, tant sur le plan professionnel que sur le plan humain. Qu'il trouve ici l'expression de toute ma reconnaissance, de ma profonde admiration et de ma respectueuse considération.

Je remercie Monsieur le Professeur PETITPREZ de m'avoir accueilli au sein du Laboratoire de Biotechnologie et Amélioration des Plantes (BAP) et Monsieur le Professeur GENTZBITTEL, Directeur du laboratoire BAP, pour ses conseils, principalement pour la partie concernant la réalisation de la carte génétique et de l'étude de l'expression des gènes.

Je tiens également à remercier Monsieur le professeur DECHAMP-GUILLAUME, pour ses conseils scientifiques en qualité de pathologiste.

Je remercie chaleureusement toute l'équipe du BAP (les chercheurs et les techniciens) ainsi que tous mes amis doctorants qui ont rendu mon quotidien plus agréable au cours de ces quelques années.

J'exprime mes remerciements aux membres du jury, particulièrement à Mr. HENRY (Directeur de Recherche à Université Paris-Sud) et à Mme. VEAR (Directeur de Recherche à l'INRA de Clermont-Ferrand) qui m'ont fait l'honneur de juger ma thèse en qualité de rapporteurs.

J'exprime ma profonde reconnaissance à mes amis, particulièrement KIAN, pour leur aide au cours de ma thèse et pendant mon séjour en France.

Evidemment, je ne peux oublier tous les stagiaires qui sont passés dans notre laboratoire pour leur bonne humeur et leur dynamisme.

Enfin, un grand merci à ma femme, SOMAIEH, pour son soutien chaleureux ainsi qu'à nos familles en IRAN.

Résumé

L'interaction 'génotype-isolat' pour la résistance partielle au *Phoma macdonaldii* chez le tournesol a été déterminée en utilisant 28 génotypes inoculés par sept isolats de ce pathogène dans des conditions contrôlées. Deux lignées AS613 et PAC2 ont été isolées, qui présentent une résistance spécifique à l'isolat MP8. Nos résultats montrent également l'existence d'une résistance non-spécifique chez les génotypes testés.

Pour déterminer l'hérédité de la résistance partielle à cette maladie, nous avons effectué des croisements entre cinq génotypes sélectionnés parmi les 28 de la première expérimentation présentant une variabilité importante pour la résistance partielle à des isolats du Phoma. Les génotypes parentaux et leurs hybrides F1 ont été inoculés par deux isolats sélectionnés (MP8 et PM10). Les aptitudes générales et spécifiques à la combinaison pour la résistance aux deux isolats sont significatives, indiquant que les effets additif et dominant des gènes sont importants dans le contrôle génétique de la résistance partielle au Phoma.

Nous avons développé une nouvelle carte de liaison du tournesol en utilisant 100 individus F2 issus du croisement entre M6-54-1 et ENSAT-B4, identifiés par nos expérimentations précédentes. Les régions génomiques contrôlant la résistance partielle aux isolats de *P. macdonaldii* ont été identifiés. Un QTL localisé sur le groupe de liaison (LG) 8 est commun aux trois isolats testés. Des QTLs spécifiques sont également identifiés pour chaque isolat.

Dans une autre expérimentation et en utilisant la carte récemment enrichie de notre laboratoire, des QTLs contrôlant la résistance partielle au Phoma ont été identifiés par l'étude d'une population de 99 LR's issue du croisement entre PAC2 et RHA266 inoculé par deux isolats (MP8 et MP10). Parmi les 10 QTLs détectés, quatre situés sur LG 5 et LG15 sont commun pour les deux isolats, les autres sont spécifiques de chaque isolat.

La variabilité génétique de 60 mutants a été étudiée en utilisant les marqueurs AFLP. Des marqueurs potentiellement associés à la résistance partielle au Phoma ont été identifiés.

Le profil de 12 gènes potentiellement associés à la résistance partielle du tournesol à *P. macdonaldii* a été testé sur le mutant M6-54-1 et la lignée originelle AS613, inoculés par trois isolats de *P. macdonaldii* en utilisant la RT-PCR quantitative. Les gènes codant pour la phenylalanine ammonia-lyase 2 (PAL2) et la thaumatine ont montré des différences significatives au niveau de l'expression, entre les interactions compatibles et partiellement compatibles. Une corrélation directe entre les niveaux d'expression de gènes codant pour le facteur de transcription HD- Zip et la protéine phosphatase avec le symptôme de la maladie a été observée chez la lignée originelle et son mutant inoculé par l'isolat, MA6.

Mots-clés: interaction génotype-isolat, mutants, résistance partielle, résistance spécifique, tache noire, tournesol, QTL, RT-PCR quantitative.

Abstract

Genotype-isolate interaction for resistance to Phoma black stem in sunflower were investigated using 28 genotypes, inoculated by seven isolates of *Phoma macdonaldii* in controlled conditions. Two specific resistant lines (AS613 and PAC2) to MP8 isolate were identified. Our results showed that there was also a wide range of isolate-nonspecific partial resistance among the genotypes tested.

In order to determine the inheritance of partial resistance to the disease, five genotypes of 28 with wide range of genetic variability for partial resistance were crossed. Parental genotypes and their F1 hybrids were inoculated by one of the two selected isolates (MP8 and PM10). General and specific combining ability effects for resistance to Phoma black stem were highly significant for each of the two isolates, indicating that additive and dominant gene effects were important in controlling partial resistance to Phoma black stem.

A new linkage map was developed using 100 F2 plants derived from the cross between M6-54-1 and ENSAT-B4 selected according to the results of the above-mentioned experiments, and the genomic regions controlling partial resistance to three *P. macdonaldii* were identified. One QTL located on linkage group (LG) 8 was common to the three isolates tested. Other QTLs were specific for each isolate separately.

QTLs controlling quantitative resistance to Phoma black stem was also investigated using our new reference map (Poormohammad kiani et al., 2007) with 99 RILs derived from the cross between PAC2 and RHA266 inoculated by the two isolates (MP8 and MP10). Through ten detected QTLs, four of them were common between two isolates on LG5 and LG15 whereas the others were specific for each isolate.

Genetic variability among a population of 60 mutant lines was studied using AFLP markers and putative molecular markers associated with partial resistance to Phoma black stem was identified.

The profile of 12 genes potentially associated with partial resistance of sunflower to *P. macdonaldii* was investigated in resistant mutant line M6-54-1 and its original line AS613, which were selected according to the results of our previous experiments using quantitative real-time RT-PCR. Plants were inoculated by three *P. macdonaldii* isolates. Genes encoding phenylalanine ammonia-lyase 2 (PAL2) and thaumatin-like protein showed significant differences in expression between partial compatible and compatible interactions. A straightforward correlation between expression levels of genes encoding HD-Zip transcription factor and protein phosphatase with disease symptom was observed in original line and its mutant inoculated by MA6 isolate.

Keywords: Genetic variation, QTL, QRT-PCR, genotype-isolate interaction, induced mutants, partial resistance, Phoma black stem, specific resistance, sunflower, *Phoma macdonaldii*,

TABLE DES MATIERES

CONTEXTE DE L'ÉTUDE ET PRESENTATION DES OBJECTIFS	8
1-Production et intérêt de la culture du tournesol	9
2-Un des facteurs limitant la production: la maladie des taches noires	10
3-Définition du sujet de thèse	11
a) Etude de la variabilité génétique de la résistance partielle au Phoma.....	11
b) Identification de QTLs et des marqueurs liés à la résistance partielle au Phoma.....	12
c) Etude de l'expression des gènes de défense chez le mutant M6-54-1 et la lignée originelle AS613.....	12
CHAPITRE I: ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	13
I-1-Le tournesol	14
I-1-1-Biologie.....	14
I-1-2-Les principales maladies du tournesol	14
I-2-Le Phoma du tournesol.....	15
I-2-1-La biologie du champignon	16
I-2-2-Le cycle de développement.....	16
I-2-3-Les modalités de la contamination.....	17
I-2-4-Les symptômes de la maladie	18
I-2-5-Les caractéristiques phénotypiques du Phoma	19
I-2-6-L'interaction isolats-génotypes	20
I-3-Évaluation de la résistance partielle au Phoma.....	20
I-3-1-Approches biométriques	21
I-3-1-1-Analyse diallèle	22
I-3-1-2-Analyse des moyennes des générations.....	23
I-3-2-Le marquage moléculaire.....	23
I-3-2-1-Les marqueurs AFLP.....	24
I-3-2-2-Les microsatellites	25
I-3-2-3-L'établissement de la carte génétique.....	26
I-3-2-4-Populations utilisées en cartographie	27
I-3-2-5-Outils informatiques	27
I-3-2-6-Cartographie de caractères quantitatifs.....	28
a) Détection de QTL en considérant les marqueurs individuellement.....	28
1-Test 't' de Student.....	28
2-Analyse de variance (ANOVA)	29
3-Méthode du maximum de vraisemblance	29
b) Méthodes de cartographie d'intervalle	29
c) Méthodes multimarqueurs.....	30
I-4-Mutations et résistance aux maladies.....	30
I-5-La réaction de défense des plantes.....	31
I-5-1-Stratégies d'identification des facteurs de défense chez les plantes	31
I-5-1-1-L'approche des puces à ADN	32

I-5-1-2-RT-PCR quantitative	32
I-5-2-Mise en evidence des gènes impliqués dans la résistance du tournesol au Phoma.....	33
CHAPITRE II: MATÉRIELS ET METHODES	35
II-1-Matériel végétal	36
II-1-1-Etude de la variabilité génétique et de l'hérédité de la résistance partielle au Phoma	36
II-1-2-Identification de QTL et marqueurs individuels liées à la résistance partielle au Phoma.....	36
II-1-2-1-Population F2 et familles F3	36
II-1-2-2-Population des lignées recombinantes (LRs)	37
II-1-2-3-Population des mutants (M6)	37
II-1-3-Etude de l'expression des gènes impliqués dans la résistance du tournesol au Phoma	37
II-1-4-Obtention des plantules	38
II-2-Matériel fongique.....	38
II-2-1-Isolement des souches de <i>P. macdonaldii</i>	38
II-2-2- Obtention d'une souche monopycniospore	39
II-2-3- Conservation des souches	39
II-2-4- Repiquage du champignon	40
II-3- Méthode de contamination	40
II-3-1- Préparation de l'inoculum	40
II-3-2- Inoculation sur pétiole de cotylédon.....	40
II-3-3- Notation des symptômes.....	41
II-4- Les interactions Génotypes – Isolats.....	41
II-5- Etude génétique en utilisant l'approches biométriques	41
II-5-1- Analyse diallèle	41
II-5-2-Analyse des moyennes des générations.....	42
II-6-Etude génétique en utilisant le marquage moléculaire	43
II-6-1-Extraction d'ADN génomique.....	43
II-6-2-Marquage par la méthode AFLP	44
II-6-2-1-Digestion de l'ADN	44
II-6-2-2-Ligation des adaptateurs.....	44
II-6-2-3-Préamplification	44
II-6-2-4-Amplification sélective	45
II-6-2-5-Séparation sur gel d'acrylamide.....	45
II-6-2-6-Analyse des profils moléculaires.....	46
a)Population F2	46
b)Population de mutants.....	46
II-6-3-Marquage par la méthode SSR	47
II-6-4-Etablissement des cartes génétiques	47
II-6-5-Identification de marqueurs individuels	47
II-6-6-Détection des QTLs	48
II-7-Analyse de l'expression de gènes de défense	48

II-7-1-Prélèvement et broyage des pétioles.....	48
II-7-2-Extraction d'ARN totaux	49
II-7-3-Traitement DNase.....	49
II-7-4- 'Reverse transcription' des ARNs messagers.....	50
II-7-5-RT-PCR quantitative	50
CHAPITRE III: VARIABILITÉ GÉNÉTIQUE ET HEREDITE DE LA RESISTANCE PARTIELLE AU PHOMA.....	52
Introduction	53
Resultats et Discussion	66
CHAPITRE IV: IDENTIFICATION DES QTLS CONTRÔLANT LA RESISTANCE PARTIELLE AU PHOMA.....	69
Introduction	70
Resultats et Discussion	101
CHAPITRE V: ETUDE DE L'EXPRESSION DES GENES IMPLIQUES DANS LA RESISTANCE DU TOURNESOL AU PHOMA	125
Introduction	126
Resultats et Discussion	149
DISCUSSION GENERALE	152
1-Evaluation de la maladie	153
2-Variabilité génétique de la résistance partielle au Phoma chez le tournesol.....	153
3-Interaction isolat-génotype:	154
4-Génétique de la résistance partielle du tournesol au Phoma	155
5-Identification des QTLs impliqués dans la résistance partielle au Phoma.....	156
5-1-Utilisation des deux cartes génétiques.....	156
5-2-Aassociation de marqueurs et résistance	158
6-Analyse de l'expression de gènes de défense.....	158
PERSPECTIVES.....	160
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	164
ANNEXE	182

CONTEXTE DE L'ÉTUDE ET PRESENTATION DES OBJECTIFS

1-Production et intérêt de la culture du tournesol

Avec une production mondiale oscillant autour de 30 millions tonnes et un rendement moyen de 12.9 q/ha, le tournesol est l'une des grandes espèces oléagineuses de la planète. Les atouts internationaux de l'espèce sont sa richesse en huile (45% de la graine), sa résistance à la sécheresse et plus généralement son faible besoin en intrants. Ces caractéristiques correspondent parfaitement à la demande sociétale actuelle vis à vis de l'agriculture.

En 2006 les principaux pays producteurs ont été la Russie/Ukraine (11.650 millions de tonnes), l'Argentine (3.900 millions de tonnes), l'Union Européenne (3.974 millions de tonnes) et l'Europe de l'Est (2.110 millions de tonnes) (<http://www.sunflowernsa.com>). A l'intérieur de l'Union Européenne, la France produit 1.45 millions de tonnes et se place au premier rang des producteurs européens devant la Hongrie qui produit, elle, environ 1.27 million de tonnes (<http://www.prolea.com>). Le rendement moyen en France est le plus élevé de tous les pays grands producteurs de tournesol (22.5 q/ha). Dans l'hexagone, 80% de la culture du tournesol se concentrent sur cinq régions. Poitou-Charentes et Midi-Pyrénées représentent à elles seules 50% des surfaces cultivées suivies des régions Centre, Pays de Loire et Aquitaine.

La demande mondiale sur le marché des graines oléagineuses et des huiles est forte. Le tournesol y tient une part essentielle puisqu'il représente 10% de la production des graines et 12% de la production d'huile; la première culture oléo-protéagineuse étant le soja avec plus de 50% de la production mondiale (<http://www.fao.org>). Plante économe en intrants et adaptée aux situations de fortes chaleurs, aux débouchés nationaux et internationaux garantis, le tournesol doit impérativement améliorer ses performances agronomiques pour rester compétitif sur les exploitations agricoles françaises. Depuis Juin 2004, l'INRA, l'ENSAT, l'ESAP, le CETIOM, les sélectionneurs privés, l'ASEDIS-SO, SOFIPROTEOL et la région Midi-Pyrénées ont décidé d'unir leurs moyens autour d'un projet commun: Tournesol 2010. Il

s'agit de renforcer les moyens consacrés à la recherche chez le tournesol, de façon à améliorer sa compétitivité globale dans les cinq à dix ans à venir. Différentes stratégies agronomiques et génétiques ont été envisagées dans le projet 'Tournesol 2010' pour améliorer la productivité.

2-Un des facteurs limitant la production: la maladie des taches noires

La maladie des taches noires ('black stem') du tournesol causée par *Phoma macdonaldii* est responsable de dégâts quantitatifs et qualitatifs chez le tournesol et depuis 1990, elle est en constante progression en France. L'agent pathogène s'attaque en effet à tous les organes de la plante, principalement la tige et ce à tous les stades phénologiques. La contamination de la tige induit un dessèchement foliaire ayant de fortes conséquences sur le remplissage des graines et le rendement en huile et en protéines. Elle est actuellement considérée comme la deuxième maladie la plus importante en France par les acteurs de la filière tournesol (Communication personnelle). L'utilisation de cultivars sélectionnés pour leur meilleure résistance partielle au Phoma, combinée à des pratiques agricoles appropriées, est un moyen efficace pour contrôler la maladie. La variabilité génétique pour la résistance partielle au Phoma a été étudiée à la fois au champ (Pérès et al., 1994) et en conditions contrôlées (Roustae et al., 2000a; Rachid Al-Chaarani et al., 2002; Bert et al., 2004). D'après les résultats des études précédentes, il existe une bonne corrélation entre le comportement des génotypes aux stades plantule et plante adulte (Roustae et al., 2000a; Larfeil, 2003). D'autre part, il a été mis en évidence que des différences de pathogénicité existent parmi les différents isolats de *P. macdonaldii* (Roustae et al., 2000b; Larfeil, 2003).

La sélection des cultivars possédant une résistance plus durable devrait par conséquent être une priorité dans l'amélioration du tournesol. L'exploitation de nouveaux gènes de résistance, une combinaison de gènes majeurs et l'accumulation de plusieurs gènes (polygènes) sont considérées comme des méthodes efficaces contre les dommages causés par la maladie des taches noires.

3-Définition du sujet de thèse

Jusqu'à ce jour, *P. macdonaldii*, n'a pas été assez pris en considération par les sélectionneurs. Actuellement compte tenu de l'importance des dégâts causés par la maladie des taches noire, il mérite donc d'être pris en compte dans les programmes de sélection. Pour la création de variétés résistantes aux maladies, l'étude de l'hérédité de la résistance est indispensable afin de mettre au point des programmes de sélection efficace. La génétique classique permet une première approche du mécanisme génétique global de la réponse à un pathogène: elle renseigne sur le nombre approximatif de gènes impliqués, les effets dominant et additif, ainsi que l'héritabilité et l'existence du phénomène d'hétérosis. Les biotechnologies, notamment le marquage moléculaire, sont des outils désormais incontournables dans les programmes de sélection. Les marqueurs moléculaires permettent d'affiner la connaissance de la génétique classique par l'établissement de cartes génétiques dans lesquelles sont localisés les QTL (Quantitative Trait Loci) impliqués dans la résistance partielle. Ces QTL sont ensuite repris dans les programmes de Sélection Assistée par Marqueurs (SAM) car ils permettent une sélection mieux contrôlée et précoce. L'approche par cartographie de QTLs est fréquemment appliquée pour les analyses de résistance quantitative à des maladies chez de nombreuses plantes d'intérêt agronomique. Mettre en évidence des gènes impliqués dans la résistance partielle du tournesol au Phoma et déterminer leur positions par rapport aux QTLs identifiés peut améliorer notre connaissance concernant la fonction de ces QTLs. En tenant compte de l'ensemble de ces raisonnements, plusieurs types d'expérimentations ont été effectuées au cours de cette thèse.

a) Etude de la variabilité génétique de la résistance partielle au Phoma

La résistance de 184 génotypes de tournesol a été évaluée avec un isolat du *P. macdonaldii* (MP6) en conditions contrôlées. Il s'agit d'une population de lignées recombinantes, d'une population de mutants produits par irradiation gamma à partir de la lignée AS613, et des

génotypes de différentes origines géographiques. Nous avons identifié plusieurs génotypes possédant une résistance partielle à la maladie des taches noires. Ensuite, l'interaction 'génotype-isolat' pour la résistance partielle au *P. macdonaldii* a été déterminée, en utilisant 28 génotypes parmi les 184, inoculés par sept isolats de ce pathogène dans des conditions contrôlées. L'hérédité de la résistance partielle à cette maladie a été également étudiée en effectuant des croisements entre cinq génotypes (sélectionnés parmi les 28 génotypes de l'expérimentation précédente) qui présentaient une variabilité importante pour la résistance partielle aux isolats du Phoma.

b) Identification de QTLs et des marqueurs liés à la résistance partielle au Phoma

Nous avons développé la deuxième carte du tournesol de notre laboratoire en utilisant 100 individus F2 issus du croisement entre M6-54-1 et ENSAT-B4, sélectionnés à partir des résultats de nos expérimentations précédentes. Les régions génomiques contrôlant la résistance partielle aux isolats de *P. macdonaldii* ont été identifiées. Dans une autre expérimentation et en utilisant la première carte de notre laboratoire récemment enrichie et le phénotypage de 99 LR_s issues du croisement entre PAC2 et RHA266, inoculées par deux isolats (MP8 et MP10), nous avons également identifié des QTLs contrôlant la résistance partielle à ces deux isolats du Phoma. Des marqueurs moléculaires potentiellement associés à la résistance partielle au Phoma ont également été identifiés en utilisant une population de mutants.

c) Etude de l'expression des gènes de défense chez le mutant M6-54-1 et la lignée originelle AS613

Le profil de 12 gènes potentiellement associés à la résistance partielle du tournesol à *P. macdonaldii* a été testé sur le mutant M6-54-1 et la lignée originelle AS613, inoculés par trois isolats de *P. macdonaldii*, en utilisant la RT-PCR quantitative.

CHAPITRE I: ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I-1-Le tournesol

I-1-1-Biologie

Le tournesol, *Helianthus annuus* L. (Figure 1) est une plante annuelle de la famille des Asteraceae (Schilling & Heiser, 1981). Originaire d'Amérique du Nord, il est allogame, entomophile et allodiploïde ($2n = 34$), résultant d'une allopoloïdisation entre une espèce du genre voisin *Vigniera* ($n = 8$) et une espèce d'*Helianthus* encore indéterminée ($n = 9$) (Heiser, 1961). Il possède une tige haute, jusqu'à 2 mètres, et des feuilles en forme de cœur. L'inflorescence du tournesol est composée de gros capitules, le plus souvent uniques, susceptibles de s'orienter face au soleil levant et portant des fleurs ligulées jaunes. Le fruit du tournesol est un akène et l'ensemble des réserves, de nature lipidique et protéique, est contenu dans les cotylédons de l'embryon.

Avec un cycle de 4 à 5 mois, une bonne tolérance aux températures élevées, des besoins en eau et en azote faibles et une grande diversité génétique, le tournesol est une plante rustique. Sa culture présente donc un grand intérêt, notamment dans les régions à climat continental et méditerranéen.

I-1-2-Les principales maladies du tournesol

Avec le développement de la culture du tournesol, plusieurs maladies ont émergé, provoquant des dommages plus ou moins importants. Ainsi, dans les années 1960, la pourriture grise du capitule (*Botrytis cinerea*), puis le Mildiou (*Plasmopara halstedii*) ont causé des dégâts considérables. D'autres champignons devenaient préoccupants de par leur extension progressive (*Sclerotinia sclerotiorum* et *Macrophomina phaseoli* Maulb.) Au cours de ces vingt-cinq dernières années, Phomopsis (*Phomopsis helianthi*) et Phoma (*Phoma macdonaldii*) sont sur le devant de la scène. Si le Phomopsis, après une attaque catastrophique en 1992 dans le sud-ouest de la France, est maintenant mieux maîtrisé, le Phoma poursuit sa

progression de façon inquiétante (Penaud & Pérès, 1994). Présent dans toutes les grandes régions de production, ses attaques se sont aggravées depuis son apparition, et sa contribution déterminante au phénomène ‘pieds secs’ en est une claire illustration (Jouffret & Penaud, 2005). Le tournesol est enfin sensible à d’autres champignons tels que *Verticillium dahliae* Kleb., *Albugo tragopogonis*, *Rhizopus*, *Erysiphe*, à des bactéries comme *Erwinia* ou *Pseudomonas* et à des parasites comme l’illustre l’orobanche, responsable de dégâts importants en Europe de l’Est et en Espagne (Vranceanu et al., 1986; Dominguez, 1996).

I-2-Le Phoma du tournesol

La maladie des taches noires du tournesol, dont l’agent causal est le champignon *Phoma macdonaldii*, devient de plus en plus préoccupante, notamment en France. Cette maladie est en constante progression en France depuis 1990 (Pérès & Lefol, 1996). Le reste de l’Europe et beaucoup de pays du monde sont également confrontés au développement de cette maladie. Elle a en effet été observée dans de nombreux pays tels que la Yougoslavie, la Bulgarie, la Hongrie, la Roumanie, les pays d’Amérique du sud (Acimovic, 1984), les Etats-Unis (Acimovic, 1984; Donald et al., 1986), l’Australie (Acimovic, 1984; Miric et al., 1999), la Chine (Hua & Ma, 1996), l’Iran (Madjidieh-Ghassemi, 1988) ou encore le Pakistan (Siddique-Mirza et al., 1988). La contamination s’effectue à tous les stades phénologiques ainsi que sur tous les organes du tournesol. Elle entraîne une diminution de la teneur d’huile et du poids de mille grains (Carson, 1991), ainsi que des pertes de rendement de l’ordre de 10 à 30%, voire 70% lorsque l’agent pathogène est à l’origine d’une sénescence prématurée de la plante (Penaud, 1996). C’est actuellement la deuxième maladie la plus importante en France par les acteurs de la filière tournesol (Communication personnelle).

I-2-1-La biologie du champignon

Le genre *Phoma* comprend plus de 2000 espèces dont beaucoup sont responsables de maladies chez de nombreuses cultures. Le champignon responsable des taches noires du tournesol a été désigné par MacDonald (1964) au Canada et Frezzi (1968) en Argentine sous le nom de *Phoma oleracea* var. *Helianthi-tuberosi*. Plus tard, Boerema (1970), en se fondant sur des critères de forme et de comportement en culture, a conclu qu'il s'agissait plutôt d'une nouvelle espèce de champignon, qu'il a décrit sous le nom de *Phoma macdonaldii* Boerema. Ce champignon se présente sous deux formes: une forme sexuée ou parfaite *Leptosphaeria lindquistii* Frezzi et une forme asexuée ou imparfaite *Phoma macdonaldii* Boerema.

Les organes de reproduction asexuée sont des pycnides de couleur brun foncé/noir. Elles contiennent des pycniospores unicellulaires, ovoïdes, plus ou moins allongées, et pourvues d'un seul noyau ainsi que de deux globules lipidiques. Ces spores, présentes pendant toute l'année, sont responsables des contaminations primaires et secondaires. Les pycnides, variables en taille et en nombre selon les souches, libèrent un cirrhe épais de couleur gris blanc à rose contenant les pycniospores. Celles-ci sont libérées par la dissolution du cirrhe sous l'action de l'eau.

Les organes de la reproduction sexuée, sont des périthèces de forme globulaire à col très court, de couleur foncée. Ils renferment des asques en forme de massue (Penaud & Pérès, 1994), ainsi que des filaments stériles, les paraphyses. Les asques contiennent huit ascospores, peu ou pas colorées, pluricellulaires (deux à quatre cellules), responsables uniquement des contaminations primaires. En effet, la forme sexuée apparaît au mois de mars sur les cannes des tournesols ayant passé l'hiver en champ.

I-2-2-Le cycle de développement

Le cycle biologique de *P. macdonaldii* est représenté sur la Figure 2. Le champignon se conserve sur des débris végétaux sous forme de mycélium qui différenciera au cours du temps

des pycnides et/ou des périthèces (Maric et al., 1981; 1987). Il peut survivre ainsi pendant trois ans à la surface du sol, les résidus de récolte constituant la source essentielle des infections. Le Phoma semble également se conserver sur les semences puisque Fayret et al. (1996) ont observé la présence du champignon au niveau du tégument ou de l'amande de la graine. Les pycniospores comme les ascospores peuvent être à l'origine des contaminations primaires. Les ascospores sont libérées au printemps, l'eau étant indispensable à ce phénomène. Elles peuvent être véhiculées par le vent ou par les insectes sur de grandes distances (Gaudet & Schultz, 1984). Pour les pycniospores, qui constituent le principal vecteur de la maladie, la libération s'effectue dès la fin de l'hiver après la dissolution du cirrhe par la pluie. Les pycniospores, issues des pycnides formées sur les nécroses suite à une contamination primaire, seront à l'origine des contaminations secondaires. Pour que l'infection réussisse, l'atmosphère doit être saturée en humidité pendant au moins 24h lorsque la température est optimale (25°C). La contamination du tournesol par *P. macdonaldii* peut s'effectuer entre 5 et 30°C (Fayzalla & Maric, 1981).

I-2-3-Les modalités de la contamination

Lors de l'infection de l'hôte au niveau du pétiole du cotylédon, les spores vont adhérer à la surface de l'organe contaminé (Roustae et al., 2000c; Larfeil, 2003). Les pycniospores sont en effets entourées d'un mucilage constitué de polysaccharides qui permet, d'une part, la fixation du champignon sur son hôte et d'autre part, de le protéger des conditions environnementales défavorables telles que la dessiccation. Chez *P. macdonaldii*, le mucilage ne présente apparemment aucune activité enzymatique, la cuticule et les parois des cellules épidermiques de l'hôte n'étant visiblement pas altérées. Sur le pétiole du cotylédon, après la germination des spores, le mycélium pénètre directement à travers la cuticule par perforation mécanique, ou indirectement à travers les stomates, en l'absence d'appressorium. Le mycélium se développe dans la paroi des cellules puis dans le cytoplasme. Le plasmalemme

se disloque, ce qui se traduit par une perte rapide de l'intégrité des cellules, et favorise la colonisation par l'agent pathogène. Des hyphes subcuticulaires ont également été observés dans les pétioles des cotylédons.

I-2-4-Les symptômes de la maladie

Au champ, le tournesol peut être attaqué par le pathogène depuis le stade cotylédonaire jusqu'à la floraison, avec une sensibilité légèrement moins forte aux stades précoces. Tous les organes de la plante peuvent être attaqués: racines, collet, tige, feuille et capitule. Selon le type d'attaque et le stade phénologique de la plante, les conséquences peuvent être plus ou moins importantes pour la culture.

Sur le collet, des macules noires peuvent apparaître suite à des contaminations très précoces indépendantes du stade de développement de la plante (Figure 3A). Ces symptômes entraînent parfois la formation de crevasses profondes. Chez les variétés sensibles, les nécroses sont allongées, crevassées, encerclant la tige et entraînent une sénescence prématurée de la plante.

Les symptômes sur tige sont caractérisés par des taches noires sur les nœuds foliaires (Figure 3B). Chez les variétés très sensibles, les nécroses au niveau de nœuds très proches deviennent encerclantes et coalescentes, allant jusqu'au noircissement total de la tige, d'où le nom de 'black stem' donné à la maladie. Larfeil (2003) a pu observer que certaines nécroses très profondes pouvaient atteindre la moelle, et ainsi entraîner la cassure de la tige. L'ensemble des symptômes sur tige et collet, favorisant le dessèchement de la plante, se traduisent par une perte de rendement.

La contamination des feuilles s'effectue de façon privilégiée au point d'insertion du pétiole sur la tige, en forme d'auget, propice à la rétention d'eau, et ainsi à la germination des spores et à la pénétration du champignon. L'infection peut également se produire le long du pétiole. Les symptômes sur pétioles se caractérisent par des taches brunes à noires, qui progressent vers la tige et le limbe. Sur le limbe, les nécroses, d'abord superficielles, se propagent le long

des nervures principales, formant ainsi un symptôme dit ‘en patte d’oie’, caractéristique de la maladie (Figure 3C). Des nécroses noires, de petite taille, peuvent aussi apparaître sur le limbe. L’évolution de ces symptômes, associés ou non, entraîne un dessèchement prématuré des feuilles par rupture de l’alimentation au niveau du pétiole. Le délai d’apparition des symptômes est de sept à dix jours après contamination par le champignon, et tous les stades de la feuille sont réceptifs aux contaminations, avec une évolution d’autant plus rapide que les feuilles sont âgées (Penaud & Pérès, 1994).

En période d’humidité intense, après la formation du capitule, des symptômes de coloration noire peuvent apparaître: sur les bractées, au point d’insertion de la tige, et sur le capitule (Figure 3D). Ces nécroses peuvent alors progresser rapidement, entraînant le dessèchement prématuré du capitule lorsqu’elles encerclent la crosse de la tige. Les semences pourront à leur tour être contaminées, permettant ainsi au champignon de se conserver sous forme de mycélium et/ou de pycnides.

I-2-5-Les caractéristiques phénotypiques du Phoma

P. macdonaldii présente une variabilité phénotypique importante, au niveau de la croissance radiale, de la pycnidiogenèse, de l’agressivité, de la morphologie culturale et de la pigmentation. (Roustae et al., 2000b, Larfeil, 2003). La croissance du champignon est majoritairement photostimulée. Elle est optimale pour des températures de l’ordre de 20 à 30°C, avec un pH compris entre 4 et 5. La croissance est inhibée par des températures extrêmes telles que 5 ou 35 °C (Roustae et al., 2000b; Larfeil 2003). Le Phoma se développe sur des milieux aussi divers que celui de Fries, Malt Agar, Potato Dextrose Agar (PDA), ou Czapek-Dox. Selon les souches, on note la présence de zones concentriques, dues au photopériodisme, au niveau desquelles se différencient les pycnides (Figure 4). En milieu agité, le mycélium se développe sous une forme très caractéristique, les ‘pellets’ ou pelotes de mycélium. *In vitro*, la germination optimale des pycniospores s’effectue dans les conditions

suivantes: une concentration de 10^6 spores par millilitre, une température comprise entre 15 et 30°C selon l'isolat, un pH de 6, une humidité relative de 95 à 100% et la germination des pycniospores est photo-indépendante (Roustae et al., 2000b). Le caractère agressif des isolats peut être relié à une origine géographique. D'autre part, le Phoma présente un fort polymorphisme moléculaire (Larfeil, 2003).

I-2-6-L'interaction isolats-génotypes

Dix souches de *P. macdonaldii*, représentant une large gamme d'agressivité ont été utilisées pour la contamination artificielle de 10 lignées de tournesol, sur pétioles de cotylédons, au stade « 1^{ère} paire de feuilles ». Les résultats de cette étude montrent qu'il existe des différences significatives entre les isolats pour leur agressivité, entre les lignées pour leur résistance partielle, ainsi qu'une interaction isolat-génotype (Larfeil, 2003). L'interaction qui existe entre les isolats et les lignées montrent que la sensibilité d'un génotype donné peut être différente selon l'isolat utilisé, ce qui pourrait indiquer l'existence de pathotypes.

I-3-Évaluation de la résistance partielle au Phoma

La résistance spécifique ou verticale correspond à une résistance monogénique ou oligogénique qui s'exprime par une réponse de type tout ou rien de l'hôte vis à vis de l'agent pathogène. Le ou les gène(s) de résistance, souvent dominants, sont facilement transmis aux génotypes sensibles par rétrocroisement. Par contre, dans le système de la résistance partielle ou horizontale, on parle de la résistance de l'hôte face à l'ensemble des souches de l'agent pathogène. Ce type de résistance est stable et correspond à une résistance polygénique gouvernée par des gènes mineurs, dont les actions individuelles ou combinées ne donnent qu'une partie de la résistance totale (Van der Plank, 1968). Les deux types de résistances (verticale et horizontale) peuvent coexister au sein d'un seul génotype.

Dans le cas de la résistance qualitative ou monogénique adaptant le concept gène pour gène, les plantes peuvent être classées comme résistantes ou sensibles. En revanche, la résistance quantitative est caractérisée par une distribution continue au niveau de la résistance. Le degré de résistance est déterminé par le potentiel pour la plante d'hôte de ralentir la croissance et/ou la multiplication de l'agent pathogène (Parlevliet, 1979). La distribution continue dans l'expression de la résistance quantitative résulte de l'interaction du génotype de la plante, de la population de l'agent pathogène et des effets de l'environnement. La résistance quantitative d'un génotype n'est pas absolue, elle est évaluée relativement à d'autres génotypes exposés à la même population de l'agent pathogène et examinés dans les mêmes conditions. La résistance quantitative a été démontrée pour différents systèmes plantes-pathogènes, par exemple pour la rouille de feuilles de maïs (Ullstrup, 1977), la rouille des céréales (Wilcoxon, 1981), l'oïdium de l'orge (Jørgensen, 1994), et *Phytophthora infestans*/ pommes de terre (Wastie, 1991).

I-3-1-Approches biométriques

Comme pour d'autres caractères quantitatifs tels que le rendement ou la hauteur de la plante, la théorie de la génétique quantitative peut être appliquée pour estimer des effets génétiques en croisements contrôlés (Mather & Jinks, 1971; Falconer & Mackay, 1997). La valeur phénotypique est divisée en valeur génotypique (le complexe de tous les gènes impliqués), déviation causée par des effets environnementaux, interaction génotype-environnement et erreur expérimentale. L'héritabilité au sens large (h^2) est définie comme le pourcentage de la variance génétique par rapport à la variance phénotypique (Hallauer & Miranda, 1981). Seule la partie héritable, c'est-à-dire la variance génétique, peut être exploitée dans la l'amélioration des plantes. La valeur génotypique peut être encore divisée en différents effets génétiques (Mather & Jinks, 1971). Ainsi, la variance génétique de tous les loci peut être divisée en effet additif, dominant et composantes de la variance épistatique. Le rapport de la variance additive

sur la variance de dominance est important pour des stratégies de sélection efficaces. L'héritabilité de la résistance quantitative dans beaucoup de systèmes plantes/pathogènes généralement a une valeur forte, indiquant que les effets génétiques sont plus importants que les effets de l'environnement.

Des inoculations artificielles sont souvent utilisées pour garantir une pression homogène d'infection et une bonne différenciation pour la sévérité de la maladie. Etant donné que la réalisation et la conduite d'un essai au champ sont très laborieux et longs, d'autres méthodes indirectes ont été développées qui permettent une prévision du niveau de résistance en champ. Chez beaucoup de pathosystèmes, des méthodes plus simples de criblage ont été établies pour évaluer des composantes de résistance partielle. Si ces méthodes sont modérément corrélées avec le niveau de résistance des plantes d'adulte dans le champ, elles peuvent être employées pour la présélection dans les pépinières des générations en disjonction.

I-3-1-1-Analyse diallèle

L'analyse diallèle est l'une des méthodes d'étude des caractères quantitatifs. Deux types d'information sont fournies par l'analyse diallèle: la connaissance de la structure génétique des parents et l'évaluation de leur valeur en croisement, ainsi que l'identification des meilleures combinaisons hybrides (Hill et al., 1998). Ces informations sont représentées par les aptitudes générales (AGC) et spécifiques (ASC) à la combinaison. L'AGC varie en fonction de l'action additive des gènes. Elle se transmet donc d'une génération à l'autre. L'ASC mesure la déviation de la performance de la F1 par rapport à la moyenne des parents. Ces données seront très utiles au sélectionneur pour lui permettre d'établir ses plans de croisements et raisonner sa sélection.

I-3-1-2-Analyse des moyennes des générations

L'analyse des moyennes des générations est une technique simple mais utile pour estimer les effets de gènes pour un caractère polygénique, son plus grand intérêt se situant dans sa capacité à estimer des effets épistatiques de gènes comme les effets 'additif x additif', 'additif x dominant' et 'dominant x dominant' (Singh & Singh, 1992).

I-3-2-Le marquage moléculaire

Bien que les approches biométriques aient eu un grand impact sur les stratégies de sélection, elles ne fournissent aucune information sur la base et la fonction moléculaires des gènes individuels (Sprague, 1983). Depuis longtemps, les sélectionneurs ont recherché des marqueurs simples du génome des plantes, qui puissent rendre compte des variations de différents caractères d'intérêt agronomique, et qui par ailleurs ne soient pas sensibles aux variations d'environnant. Les marqueurs morphologiques ont été retenus dans un premier temps. Plus récemment, des marqueurs enzymatiques ont été utilisés. Chez le maïs, une quarantaine de marqueurs enzymatiques ont été identifiées et localisées sur les dix chromosomes (Lefort-Buson et al., 1990; de Vienne et Santoni, 1998). Mais ce type de marqueur est d'un usage limité par le faible nombre de locus susceptibles d'être révélés. C'est durant les années 80 que le premier marqueur moléculaire 'RFLP' est apparu (Bostein et al., 1980). Durant les vingt dernières années, les programmes technologiques de détection des marqueurs moléculaires, ainsi que le développement de l'analyse informatique des données issues de marqueurs, ont entraîné une véritable explosion dans le domaine de la cartographie génétique. En effet, le polymorphisme révélé par les marqueurs moléculaires est quasiment illimité, parce qu'il concerne toute séquence d'ADN répétée ou non répétée, qu'elle soit codante ou non. Le développement de nouvelles biotechnologies basées sur les marqueurs moléculaires a permis de construire des cartes génétiques, et a offert la possibilité d'identifier et de repérer les QTLs contrôlant les caractères d'intérêt agronomique. Depuis le début des

années 1980, de nombreux marqueurs moléculaires ont été mis à disposition des chercheurs, et de nouveaux sont régulièrement décrits. Les techniques principales utilisées par les chercheurs sont les suivantes: RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), SSR (Simple Sequences Repeat), RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA), SCAR (Sequenced Characterized Amplified Region), CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence), STS (Sequence Tagged Site), EST (Expressed Sequence Tagged), SNP (Single Nucleotide Polymorphism), SSCP (Single Strand Conformation Polymorphisme). Les deux techniques d'AFLP et de SSR utilisées dans nos essais sont décrites plus en détail ci-dessous.

I-3-2-1-Les marqueurs AFLP

C'est une technique de marquage moléculaire permettant de révéler par PCR des polymorphismes de restriction. Cette technique est très fiable et fournit beaucoup plus d'informations que la technique RAPD, puisqu'elle amplifie 10 fois plus de fragments. Dans cette technique, l'ADN est digéré par 2 enzymes de restriction différentes qui créent des extrémités cohésives. Il est préférable de choisir une enzyme qui coupe fréquemment et une autre plus rarement, ceci pour obtenir des fragments d'ADN de 50 à 500 paires de bases. Deux adaptateurs, compatibles avec les sites de restrictions, sont ligaturés aux fragments d'ADN. Ensuite, des amorces spécifiques des adaptateurs, auxquelles on ajoute quelques bases aux extrémités 3' vont venir s'hybrider. Les fragments d'ADN seront amplifiés, au cours d'une réaction de PCR en conditions strictes, uniquement s'ils présentent une complémentarité parfaite avec les bases sélectives. Les produits d'amplification sont ensuite analysés sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes après avoir réalisé un marquage radioactif de l'une des amorces (Figure 5). Les marqueurs AFLP ont été utilisés dans la cartographie de plusieurs espèces végétales comme le riz (Mackill et al., 1996), le maïs (Castiglioni et al., 1999), la tomate (Haanstra et al., 1999), le melon (Wang et al., 1997), la laitue (Jeuken et al., 2001) et

le tournesol (Flores Berrios et al., 2000; Gedil et al., 2001; Rachid Al-Chaarani et al., 2002) ainsi que dans des études de résistance aux maladies virales comme la mosaïque du concombre (Ben-Chaim et al., 2001), ou la recherche de QTLs comme ceux conférant la résistance au sclerotinia chez le tournesol (Rönicke et al., 2005). Chez le tournesol, la carte génétique basée sur les marqueurs AFLP, en utilisant des lignées recombinantes, a permis d'identifier des QTLs liés à l'organogenèse (Flores Berrios et al., 2000). Cette même carte de tournesol a permis l'étude de caractères physiologiques et agronomiques pour lesquels plusieurs QTLs ont été mis en évidence (Hervé et al., 2001; Rachid Al-Chaarani et al., 2004), ainsi que l'identification de QTLs contrôlant la résistance au mildiou et au Phoma (Rachid Al-Chaarani et al., 2002). Une autre carte génétique a été également établie en utilisant des marqueurs SSRs et AFLPs. Cette carte a permis d'identifier des QTLs liés à quelques caractères d'intérêt agronomique chez le tournesol (Mokrani et al., 2002).

I-3-2-2-Les microsatellites

Ce sont des motifs simples, constitués de quelques paires de bases répétées en tandem, montrant une variation de leur longueur. Ces marqueurs sont dispersés de façon assez dense sur l'ensemble du génome des Eucaryotes. La technique de marquage est basée sur l'amplification par PCR en utilisant une paire d'amorces flanquant les microsatellites (Figure 6). Les marqueurs RFLP, nécessitant une certaine technicité et un coût élevé, limitent le nombre d'individus analysés, alors que les microsatellites permettent d'analyser des populations dix fois plus grandes que celles couramment utilisées avec les RFLP (Ribaut et al., 1997). Ces marqueurs ont été très utiles pour des recherches concernant la diversité génétique chez l'orge (Struss & Plieske, 1998), la construction de cartes génétiques chez le pois chiche (Winter et al., 1999), le blé (Plaschke et al., 1995), le pommier (Guilford et al., 1997), la canne à sucre (Rae et al., 2000), le riz (Temnykh et al., 2000), le kiwi (Testolin et al., 2001) et le tournesol (Tang et al., 2002, 2003b; Mokrani et al., 2002; Yu et al., 2002,

2003; Micic et al., 2004, 2005a,b; Poormohammad Kiani et al., 2007)). On les a également utilisés dans l'identification de marqueurs liés à des gènes de résistance, comme le gène *Yr15*, conférant la résistance à la rouille chez le blé (Chargué et al., 1999) ou la recherche de QTLs comme ceux conférant la résistance au sclerotinia chez le tournesol (Micic et al., 2004, 2005a,b).

I-3-2-3-L'établissement de la carte génétique

La construction de cartes génétiques permet une meilleure localisation des zones chromosomiques d'intérêt grâce à l'identification des marqueurs flanquants (Knapp et al., 1990). L'accès direct au génome des plantes permettrait sans doute de réduire la durée et d'optimiser les schémas classiques de sélection, souvent coûteux en temps, en main d'œuvre et en espace. Une carte de liaison génétique est établie par l'étude de la transmission des caractères deux à deux. Le phénomène de 'crossing-over' est la base de la notion de liaison. L'établissement d'une carte nécessite donc l'étude génétique des caractères polymorphes d'une population provenant du croisement entre deux génotypes différents. Le principe d'établissement de cartes génétiques à partir de marqueurs moléculaires est identique à celui utilisé pour établir des cartes génétiques de caractères morphologiques. On utilise une génération polymorphe, descendante d'un croisement afin de génotyper des individus, des lignées ou des familles pour des marqueurs montrant du polymorphisme entre les parents. Lorsque plusieurs marqueurs présentent des taux de recombinaison inférieurs à 50%, ils forment alors ce que l'on appelle un groupe de liaison. On teste tous les couples de marqueurs en choisissant un risque très faible de déclarer liés des marqueurs indépendants (Lufort-Buson et al., 1990). Si le nombre de marqueurs utilisés est suffisamment grand, le nombre de groupes de liaison doit correspondre au nombre de chromosomes. Une carte génétique est présentée par des groupes de liaison dont l'une des extrémités commence par zéro. Toutes les distances calculées entre les couples de marqueurs qui se succèdent à partir de cette extrémité

sont additionnées les unes aux autres. Les distances sont calculées par l'une des deux formules présentées par Haldane (1931) ou Kosambi (1944):

$$M_H = -(1/2) \ln (1-2r)$$

Ou: M_H est la distance de Haldane en Morgan ou centimorgan et r est le taux de recombinaison

$$M_K = 25 \ln [(1+2r)/(1-2r)]$$

Ou: M_K est la distance de Kosambi en Morgan ou centimorgan et r est le taux de recombinaison

I-3-2-4-Populations utilisées en cartographie

La nature des populations (individus F₂, familles en ségrégation, lignées recombinantes ou haploïdes doublés) et leur nombre sont des facteurs importants pour la précision de la carte génétique qui en découle. De manière générale, on reconnaît un grand intérêt à l'analyse des populations haploïdes doublées (HD) pour la cartographie, notamment en raison d'un plus grand déséquilibre de liaison (Maksem & Kahl, 2005). Cependant, les lignées HD présentent parfois une certaine distorsion dans la ségrégation des marqueurs. Les lignées recombinantes constituent également un outil important dans la cartographie (Burr & Buur, 1991). Les plantes F₂ hétérozygotes ont un pouvoir informatif supérieur aux lignées recombinantes (RILs), aux haploïdes doublés et aux backcross (Darvasi, 1998).

I-3-2-5-Outils informatiques

Il est bien évident que la gestion des informations qui sont nécessaires à l'élaboration de ces types de cartes nécessite l'emploi de logiciels, comme Mapmaker (Lander et al., 1987), Join Map (Stam, 1993), G-Mendel (Holloway & Knapp, 1993), Carthagène 1.0 (De Givry et al., 2005), qui ont été créés dans ce but. Les algorithmes y sont un peu différents, même si la réponse apportée est en général cohérente entre les logiciels. La première étape de création

d'une carte consiste en l'élaboration des groupes de liaison, la suivante dans l'ordonnement des marqueurs à l'intérieur d'un groupe de liaison. On constate de manière générale que les logiciels sont plus ou moins adaptés à la population étudiée (backcross, lignées recombinantes, F_2 , haploïdes doublés, etc).

I-3-2-6-Cartographie de caractères quantitatifs

Pour la détection des QTLs (Quantitative Trait Loci) impliqués dans le contrôle d'un caractère donné, il est nécessaire de: (1) choisir des parents présentant du polymorphisme afin d'obtenir une descendance en ségrégation (2) déterminer le génotype de chaque descendant (génotypage) (3) mesurer la valeur du caractère quantitatif recherché pour chaque individu, famille ou lignée étudiée (phénotypage) et (4) utiliser une méthode biométrique afin de corréliser les locus marqueurs au caractère étudié. Il existe 3 catégories de méthodes biométriques utilisées pour détecter les QTLs, selon que l'on analyse les marqueurs individuellement, deux par deux ou par groupe.

a) Détection de QTL en considérant les marqueurs individuellement

Cette méthode de détection est basée sur la comparaison des moyennes aux différents locus, pour chaque génotype. Nous pouvons utiliser l'une des méthodes d'analyse suivantes:

1-Test 't' de Student

Il peut être utilisé pour les populations pour lesquelles il n'existe que deux classes de marqueurs comme le backcross (F_1 x parent récessif), les lignées haploïdes doublées (DH) et les lignées recombinantes (RILs) (Markel et al., 1996).

2-Analyse de variance (ANOVA)

On considère qu'il existe un QTL lié au marqueur si le test F (σ^2 intra/ σ^2 inter) est significatif. Cette méthode peut être utilisée dans les populations F2 présentant trois génotypes pour le marqueur: MM, Mm et mm (marqueurs co-dominants).

3-Méthode du maximum de vraisemblance

La méthode du maximum de vraisemblance permet l'estimation des effets directs du QTL et du taux de recombinaison. Cette approche est moins puissante que l'analyse de variance, surtout lorsque le QTL est très proche du marqueur (De Vienne & Causse, 1998). La vraisemblance est fonction de la probabilité de disposer d'un génotype QTL et d'avoir une valeur phénotypique associée à ce génotype QTL (Lander & Botstein, 1989). Ce type d'analyse est simplifié grâce à l'utilisation de logiciels statistiques. L'ordre des gènes ainsi qu'une carte génétique complète ne sont pas nécessaires. Cependant, la carte permet de mieux présenter les résultats (Liu, 1998). Par contre, si la densité de marqueurs est faible, cette méthode est peu efficace pour l'estimation de la position et des effets des QTLs (De Vienne & Causse, 1998).

b)Méthodes de cartographie d'intervalle

Les méthodes de cartographie d'intervalle partent de l'hypothèse qu'il existe un QTL ou plus dans l'intervalle entre deux marqueurs liés par un taux de recombinaison r . (De Vienne & Causse, 1998). Trois méthodes ont été décrites: la méthode linéaire basée sur les moyennes au marqueur, la cartographie d'intervalle par maximum de vraisemblance (SIM: Simple Interval Mapping) (Lander & Botstein, 1989) et la cartographie d'intervalle par régression multiple (Haley & Knott, 1992). Dans ces méthodes, le nombre de QTLs et leurs localisations ne sont pas toujours bien résolus et les positions exactes des QTLs sont difficiles à déterminer. De même, l'outil statistique est relativement peu puissant. Par ailleurs, un seul pic peut être

identifié lorsque deux QTLs sont très proches l'un de l'autre. Le pic, dans ce cas, va être faible et très large. De même, lorsque les QTLs liés présentent des effets répulsifs, le pic sera soit bas, soit complètement éliminé (Liu, 1998).

c) Méthodes multimarqueurs

Les méthodes par marqueurs multiples tentent de résoudre les difficultés provenant de la présence éventuelle de plusieurs QTLs liés sur un chromosome ou de réduire le bruit de fond généré par les QTLs ne ségrégeant pas avec les marqueurs. Kearsey & Hyne (1994) ont proposé une approche basée sur la régression linéaire. Dans cette méthode, la position la plus probable du QTL est celle où la résiduelle du modèle de régression est la plus faible. Cette méthode est simple, cependant, elle ne peut être utilisée avec des marqueurs dominants en F2 (Kearsey & Hyne, 1994).

La cartographie par intervalle composite (CIM: Composite Interval Mapping) combine la méthode du maximum de vraisemblance (SIM: Simple Interval Mapping) et la régression multiple (Zeng, 1993, 1994). Cette méthode présente des avantages par rapport au SIM, à l'analyse de marqueur simple et aux modèles multi-QTLs qui utilisent la régression multiple. Un des avantages du CIM, en fait le plus important, est que d'autres marqueurs peuvent être utilisés pour réduire le nombre et les positions des QTLs et identifier les plus probables. De plus, la qualité de la résolution des localisations des QTLs peut être augmentée (Liu, 1998).

I-4-Mutations et résistance aux maladies

La réussite des programmes de sélection pour la création de nouvelles variétés et hybrides résistants aux maladies nécessite l'existence d'une variabilité génétique pour les caractères souhaités. Malheureusement, cette variabilité est souvent manquante. Cependant, des mutations peuvent être induites artificiellement et générer une grande variabilité génétique dans la population provenant de la mutagenèse (Brunner, 1995). En ce qui concerne la

création de variétés résistantes à partir de mutants, de nombreux travaux ont été effectués. Ainsi, de nombreux caractères issus d'une population de mutants induits ont été incorporés dans des cultivars commercialisés, notamment la résistance à *Fusarium* chez la tomate (Evans, 1989) et au mildiou chez l'orge (Jorgensen, 1992). Chez le blé, Boyd et al. (2002), ont effectué le criblage d'une population de mutant qui a révélé un grand nombre de génotypes présentant une meilleure résistance aux rouilles jaune et brunes par rapport aux génotypes témoins. De même, en étudiant le comportement de mutants de blé vis-à-vis du mildiou, Duggal et al. (2000) ont identifié deux mutants significativement plus résistants que la lignée sensible d'origine.

Le laboratoire de Biotechnologies et Amélioration des Plantes (BAP) dispose d'une population de mutants de tournesol. Alejo-Jaimes et al. (2003) et Nabipour et al. (2004) ont travaillé sur les caractères physiologiques, morphologiques, agronomiques et la germination des graines de cette population, mais aucun travail n'a été entrepris sur la résistance des ces mutants à *P. macdonaldii*.

I-5-La réaction de défense des plantes

L'apparition d'une résistance à une maladie dépend de la capacité de la plante à reconnaître un signal du pathogène au début de l'infection. L'initiation de la résistance de la plante met en œuvre successivement (Tani, 2001) : la reconnaissance de molécules libérées par le pathogène pendant l'infection, la mise en place d'une signalisation capable de transformer la reconnaissance initiale en signal intracellulaire qui conduit à l'expression des gènes impliqués dans diverses réponses cellulaires liées à la résistance aux maladies.

I-5-1-Stratégies d'identification des facteurs de défense chez les plantes

Deux types d'approches, une avec *a priori* comme la RT-PCR quantitative et une autre sans *a priori* comme l'approche des puces à ADN sont envisageables.

I-5-1-1-L'approche des puces à ADN

Le principe de l'analyse microarray est le suivant (Sensen, 2005) : les ARNs totaux sont extraits des différents échantillons dont on veut comparer l'expression. Les ARNs messagers sont ensuite transformés en ADNc par transcription inverse. Lors de cette étape, les ADNcs sont marqués. Ils seront ensuite hybridés à des molécules d'ADN, correspondant à différents gènes, fixées au préalable sur une matrice solide. L'ADN fixé sur le support solide étant en excès, et l'hybridation s'arrêtant pendant la phase linéaire, le niveau de signal mesuré à la suite de l'hybridation traduira l'abondance d'une séquence donnée parmi la population d'ARNs de départ. On appelle cible, les molécules d'ADN présentes sur la puce et sonde, les molécules d'ADN marquées en solution (Figure 7). Afin de déchiffrer la logique de la régulation des gènes, il faut contrôler le niveau d'expression de tous ces gènes simultanément, avec une bonne sensibilité. L'information issue de l'analyse microarray permet de décrire les gènes différentiellement exprimés entre deux conditions données, et ainsi de mieux caractériser leur fonction (Caldo et al., 2004). Des gènes exprimés de façon spécifique dans chaque condition pourront être mis en évidence: ce sont des gènes marqueurs. Le cas de gènes co-exprimés dans une même condition peut également se présenter, il permettra de mettre en évidence des co-régulations et des interactions.

I-5-1-2-RT-PCR quantitative

La méthode est basée sur la détection de fluorescence émise par le produit PCR nouvellement formé, la mesure s'effectue en même temps que la réaction a lieu (i.e. en temps réel). On utilise un produit intercalant qui ne devient fluorescent que s'il se lie à l'ADN, le SYBR green (Bustin, 2002; Bustin et al., 2005). Pour analyser les résultats de la PCR quantitative, on emploie une méthode qui consiste à quantifier le changement de niveau du gène d'intérêt par rapport à un témoin. Cette quantification du changement relatif de l'expression des gènes est basée sur la méthode du $2^{-\Delta\Delta CT}$ décrite par Livak et Schmittgen (2001). Il s'agit de fixer un

seuil Ct (threshold Cycle) correspondant au nombre de cycles pour lequel le signal d'amplification est au dessus du bruit de fond, mais la courbe d'amplification restant en phase exponentielle. La comparaison du Ct du gène par rapport au Ct d'un gène témoin (comme l'*actine*) permet de définir le niveau d'expression du gène dans les différentes conditions testées.

I-5-2-Mise en évidence des gènes impliqués dans la résistance du tournesol au Phoma

Grâce à la mise au point d'une puce a ADN composée de 1000 unigènes, dont plus de 100 impliqués dans la résistance des plantes aux maladies, Alignan et al. (2006) ont pu mettre en évidence l'expression différentielle de certains gènes en comparant un génotype partiellement résistant et un génotype sensible, en réponse à l'infection par un isolat de *P. macdonaldii* 'MP6'. Ces gènes pourraient être impliqués dans la résistance du tournesol à *P. macdonaldii*. Au vu des résultats obtenus, ils ont établi un modèle dans lequel la régulation négative d'une MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) phosphatase à double spécificité pourrait être impliquée dans les mécanismes de défense du tournesol en réponse à *P. macdonaldii* (Figure 8). L'activation résultante d'une cascade MAP kinase pourrait impliquer des réponses de défense (biosynthèse de thaumatine, activation de la phénylalanine ammonia-lyase, pouvant engendrer la synthèse de phytoalexines), sous le contrôle de facteurs de transcription appartenant aux familles MYB et WRKY. Parallèlement, l'activation d'une protéine phosphatase 2A, impliquée dans l'inhibition de la mort cellulaire, pourrait limiter le développement de l'agent pathogène. Étonnamment, ils n'ont pas observé de changements du niveau d'expression des 15 gènes impliqués dans les voies de l'acide salicylique (SA), de l'acide jasmonique (JA) ou de l'éthylène dans la réponse du tournesol à *P. macdonaldii*. Néanmoins, ceci n'implique pas que cette réponse est indépendante de SA, de JA et de la signalisation par l'éthylène. Il serait désormais très intéressant de tester les gènes identifiés avec d'autres génotypes partiellement résistants et également avec d'autres souches de Phoma

très agressives, ou au contraire, non pathogènes. Des résultats issus de ces études complémentaires permettraient une vue plus précise des mécanismes de défense du tournesol face à l'agent pathogène considéré. Il serait d'autre part intéressant de relier les gènes différentiellement exprimés identifiés par microarray, aux QTLs identifiés pour la résistance partielle à *P. macdonaldii*.

CHAPITRE II: MATÉRIELS ET METHODES

II-1-Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé est différent suivant l'objectif de l'étude.

II-1-1-Etude de la variabilité génétique et de l'hérédité de la résistance partielle au Phoma

La résistance de 184 génotypes de tournesol a été évaluée avec un isolat de *Phoma macdonaldii* (MP6) en conditions contrôlées. Il s'agit de lignées recombinantes (LRs) et de leurs lignées parentales (PAC2 et RHA266), d'une population de mutants produits par irradiation gamma à partir de la lignée AS613, ainsi que des génotypes de différentes origines géographiques (Annexe 1). Plusieurs génotypes montrant une résistance partielle à la maladie des taches noires ont été identifiés (Annexe 1). L'interaction 'génotype-isolat' pour la résistance partielle au *P. macdonaldii* chez le tournesol a été déterminée en utilisant 28 génotypes, sélectionnés parmi les 184, inoculés par sept isolats de ce pathogène dans des conditions contrôlées. L'hérédité de la résistance partielle à cette maladie a été analysée en utilisant cinq génotypes sélectionnés parmi les 28 génotypes de la première expérimentation et leurs hybrides F1 présentant une variabilité importante pour la résistance partielle aux isolats du Phoma.

II-1-2-Identification de QTL et marqueurs individuels liés à la résistance partielle au Phoma

II-1-2-1-Population F2 et familles F3

Sur la base des résultats de l'étude de l'interaction 'génotype-isolat', une lignée présentant une résistance partielle à la majorité des isolats du Phoma (M6-54-1), et une lignée relativement sensible à tous les isolats (ENSAT-B4) ont été retenues pour créer les descendance F1. Le génotype M6-54-1 est un mutant obtenu à partir de l'irradiation des graines de la lignée AS613 par les rayons gamma. Les hybrides F1 ont été vérifiés par analyse

génotypique des marqueurs microsatellites (SSR). Une plante F1 issue du croisement M6-54-1 \times ENSAT-B4 a été autofécondé pour la constitution d'une population F2 de 105 individus, utilisés pour construire la carte génétique. Plantes F2 ont été autofécondées pour obtenir les familles F3 qui ont été utilisées pour évaluer la résistance partielle à la maladie.

II-1-2-2-Population des lignées recombinantes (LRs)

Les lignées recombinantes (LRs) utilisées dans nos expérimentations, ont été créées par la méthode SSD (Single Seed Descent) à partir du croisement entre les génotypes PAC2 et RHA266. Notre laboratoire dispose d'un ensemble de 150 lignées recombinantes dont une partie ont été utilisées pour la réalisation de nos expérimentations. Les lignées parentales des LRs présentent une réponse contrastante dans leur résistance partielle à deux isolats du Phoma dans l'étude de l'interaction 'génotype-isolat'.

II-1-2-3-Population des mutants (M6)

Le laboratoire de Biotechnologies et Amélioration des Plantes a généré une lignée de tournesol appelée AS613 issues d'un croisement entre ENSAT-125 et ENSAT-704. Cette lignée a été choisie pour être la cible d'un traitement mutagène et des akènes ont alors été soumis à une irradiation gamma (75 grays) au Centre de Recherche du Commissariat à l'Energie Atomique de Cadarache. Le laboratoire possède ainsi actuellement une collection de plus de 2000 mutants homozygotes obtenus après autofécondation. Notre travail concerne l'étude du comportement de 120 mutants, choisis au vu de leurs différences phénotypiques avec la lignée d'origine AS613 (Annexe 1).

II-1-3-Etude de l'expression des gènes impliqués dans la résistance du tournesol au Phoma

Pour mener cette étude, nous avons utilisé deux lignées de sensibilités opposées aux isolats de *P. macdonaldii*. Il s'agit du mutant M6-54-1, résistant à l'isolat MA6 mais sensible à l'isolat

MP8, et de sa lignée d'origine AS613 qui est résistante à l'isolat MP8 mais sensible à l'isolat MA6.

II-1-4-Obtention des plantules

Les semences de tournesol sont désinfectées à l'hypochlorite de sodium à 6 degrés chlorométriques durant 5 minutes, avant d'être rincées trois fois successivement à l'eau distillée stérile. Les graines peuvent alors être semées, à deux centimètres de profondeur, dans des bacs en plastique (50×38×10cm) contenant du terreau (Hawita Flor, Allemagne; <http://www.hawita-gruppe.de/>), en serre. L'arrosage est réalisé avec de l'eau uniquement. Lorsque les plantules ont atteint le stade de la deuxième paire de feuilles (stade B3-B4, Annexe 2) (Schneiter & Miller, 1981), elles sont transférées en chambre climatisée (température de $18\pm1^{\circ}\text{C}$ la nuit, et $25\pm1^{\circ}\text{C}$ le jour, photopériode de 14 heures, 75 à 85% d'humidité relative, avec une intensité lumineuse de $200\ \mu\text{E m}^{-2}\text{ s}^{-1}$, deux jours avant l'inoculation.

II-2-Matériel fongique

II-2-1-Isolement des souches de *P. macdonaldii*

Les souches de champignon utilisées sont issues de fragments de cannes de tournesol d'origines diverses, porteuses des symptômes caractéristiques de la maladie. Ces fragments sont désinfectés par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 6 degrés chlorométriques pendant 5 minutes, puis rincés 3 fois avec de l'eau distillée stérile. Ils sont ensuite déposés en conditions stériles sur un milieu PDA (Potato Dextrose Agar) (DIFCO) en boîte de Pétri. Les boîtes sont placées dans un incubateur à $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ avec une photopériode de 12 h et une intensité lumineuse de $37\ \mu\text{E m}^{-2}\text{ s}^{-1}$. Après 2 à 3 jours, le mycélium commence à se développer et la sporulation est induite.

II-2-2- Obtention d'une souche monopycniospore

A partir de chaque culture provenant d'un symptôme, et après photo-induction de la conidiogénèse (photopériode de 12h, 25°C, intensité lumineuse de $37 \mu\text{E m}^2 \text{s}^{-1}$), une suspension conidienne mère est réalisée dans de l'eau distillée stérile. Avec chaque suspension conidienne mère, par dilutions successives, une suspension conidienne contenant environ 10^4 conidies par mL est établie; cette concentration permet, à l'aide d'une pipette Pasteur, de déposer sur une lamelle stérile 4 à 5 microgouttes ne retenant qu'un nombre très réduit de conidies, voire d'une seule. L'observation du nombre de conidies présentes dans une microgoutte s'effectue au microscope, le dessèchement des microgouttes étant évité par l'usage d'une chambre humide de Van Tieghem préalablement stérilisée. Après avoir repéré la ou les microgouttes ne renfermant qu'une seule conidie, ces dernières sont captées individuellement par capillarité à l'aide d'un triangle de papier filtre stérilisé. Ce fragment de papier filtre ainsi chargé d'une conidie est déposé à la surface du substrat nutritif (PDA), en conditions aseptiques, et mis à incuber à 25°C sous un régime photopériodique de 12 heures et une intensité lumineuse de $37 \mu\text{E m}^2 \text{s}^{-1}$.

II-2-3- Conservation des souches

Un disque mycélien provenant d'une culture pure de champignon est déposé sur un milieu PDA. De part et d'autre, on place des fragments de cannes sains désinfectés et autoclavés 25 min à 110°C. Après 15 jours d'incubation, ($25 \pm 1^\circ \text{C}$, avec une photopériode de 12 h et une intensité lumineuse de $37 \mu\text{E m}^2 \text{s}^{-1}$), le mycélium colonise le milieu et différencie des pycnides sur les fragments de cannes. Ces derniers sont alors placés dans des tubes à hémolyse stérile contenant du CaCl_2 , qui permet de garder un environnement sec. Les tubes sont fermés avec du coton, parafilmés, puis conservés au réfrigérateur à 4°C. Le champignon se conserve ainsi durant plusieurs années en gardant ses propriétés morpho-physiologiques. Cette méthode avait été appliquée avec succès pour la conservation de *Dreschlera teres*

(Barrault, 1989). Alternativement, les souches de *P. macdonaldii* peuvent être conservées à -80°C sous forme de suspensions de pycniospores (10^6 pycniospores/ml) contenant 50% de glycérol (Sigma).

II-2-4- Repiquage du champignon

Des disques mycéliens provenant d'une culture de Phoma sur milieu PDA ou encore des fragments de canne colonisés par le champignon sont déposés stérilement sur milieu PDA, en boîtes de Pétri. Les boîtes sont mises à incuber pendant 10 jours à 25°C sous un régime photopériodique de 12 heures et une intensité lumineuse de $37 \mu\text{E m}^2 \text{s}^{-1}$.

II-3- Méthode de contamination

II-3-1- Préparation de l'inoculum

La solution utilisée est constituée d'eau distillée stérile contenant 0.5% de jus d'orange (favorisant la germination) et 0.25% de gélatine (augmentant l'adhérence). Après 20 min de stérilisation à 120°C, le pH est ajusté à 6, ce qui est optimum pour le développement du champignon. Trois millilitres de cette solution sont déposés à la surface de la culture de *P. macdonaldii* âgée de dix jours. Par agitation mécanique, on obtient une suspension de pycniospores qui est ajustée à la concentration finale de 10^6 pycniospores par mL, par comptage à la cellule de Malassez. Vingt-quatre heures après la préparation de l'inoculum, la germination des pycniospores est contrôlée au microscope.

II-3-2- Inoculation sur pétiole de cotylédon

L'inoculation est réalisée selon un protocole mis au point au laboratoire (Roustae et al., 2000a). Vingt microlitres de suspension de pycniospores sont déposés à l'insertion des pétioles de cotylédons sur la tige. La suspension étant extemporanée, nous sommes assurés qu'aucune spore n'a germé avant le début de l'expérimentation. Les plantules sont ensuite

placées en atmosphère saturée en humidité pendant 48 heures, afin de garantir une contamination optimale.

II-3-3- Notation des symptômes

La lecture des symptômes s'effectue 7 jours après contamination, grâce à une échelle de notation élaborée au laboratoire. Cette échelle est basée sur le pourcentage de surface nécrosée du pétiole de cotylédon; les notes s'étendent de 1 (pas de nécrose) à 9 (pétiole totalement nécrosé) (Tableau 1 et Figure 9).

II-4- Les interactions Génotypes – Isolats

Les interactions spécifiques entre génotypes et isolats ont été identifiés par une méthode statistique robuste, le «médiane polish» (Tukey, 1977; Arraiano & Brown, 2006). La méthode a été appliquée pour construire un modèle additif afin d'exprimer une note moyenne, correspondant à la sévérité de la maladie, en fonction de chaque paire 'génotype-isolat'. Cette méthode calcule la note médiane des isolats pour l'ensemble des génotypes, et réciproquement la note médiane des génotypes pour le pool d'isolats. En l'absence d'interaction 'génotype-isolat', la distribution des résidus du modèle suit une loi Normale. Si le résidu sortant de cette distribution normale, dit «outlier», est négatif le génotype est résistant. En revanche, si le résidu est positif il est sensible à l'isolat étudié. La signification statistique de l'écart des résidus a été estimée grâce à la méthode de Grubbs (Sokal & Rolf, 1981; Brown et al., 2001). Cette analyse a été réalisée à l'aide de Microsoft Excel 2002.

II-5- Etude génétique en utilisant l'approches biométriques

II-5-1- Analyse diallèle

Un programme diallèle a été réalisé à partir de cinq génotypes de tournesol d'origines différentes, sélectionnés à partir des résultats de nos expérimentations précédentes ayant des

caractères agronomiques différents et résistants ou sensibles à *P. macdonaldii*. Il s'agit de lignées, ENSAT-B5, ENSAT-R5, B454/03, SDR18 et M6-54-1, qui ont subi des autofécondation successives. Les croisements possibles ont été effectués entre les cinq lignées de manière à obtenir 10 combinaisons F1 d'un diallèle incomplet. Les lignées ainsi que leurs hybrides F1 ont été semées en phytotron dans le cadre d'une expérimentation en blocs randomisés avec trois répétitions, puis inoculées par deux isolats sélectionnés (MP8 et PM10). Les analyses diallèle ont été conduites selon la méthode 2 et le modèle 1 de Griffing (Griffing, 1956) employant le programme de SAS pour l'analyse du diallèle de Griffing (Zhang et al., 2005). Le modèle statistique est le suivant:

$$Y_{ij} = \mu + \lambda_i + \lambda_j + S_{ij} + e_{ij}$$

Où: μ = moyenne de la population, $\lambda(\lambda_j)$ = aptitude générale à la combinaison (AGC) du parent i(j), S_{ij} = aptitude spécifique à la combinaison du croisement i par j et e_{ij} = effet de l'environnement sur l'individu i et j.

II-5-2-Analyse des moyennes des générations

Des croisements ont été effectués entre M6-54-1, une lignée mutante identifiée résistante au Phoma, et une lignée sensible ENSAT-B4, sélectionnée à partir des résultats des expérimentations précédentes. Les lignées parentales aussi bien que les générations F1, F2, BC1P1 et BC1P2 ont été semées en phytotron dans une expérimentation en blocs randomisés avec trois répétitions et inoculées par des isolats sélectionnés. L'analyse des moyennes des générations a été conduite selon la méthode de Gamble (1962). Les équations utilisées pour estimer les paramètres génétiques sont résumé dans le Tableau 2.

Les variances phénotypique, génotypique, additive et environnementale sont estimées à partir des formules suivantes:

$$\delta^2_P = \delta^2_{F2}$$

$$S^2_E = (S^2_{P1} + S^2_{P1} + 2S^2_{F1})/4$$

$$\delta^2_G = \delta^2_P - \delta^2_E$$

$$\delta^2_A = [2 \times \delta^2_{F2}] - [\delta^2_{BC1P1} - \delta^2_{BC1P2}]$$

II-6-Etude génétique en utilisant le marquage moléculaire

Des QTLs contrôlant la résistance quantitative au Phoma ont été identifiées en utilisant 100 individus F2 issus du croisement entre M6-54-1 et ENSAT-B4 et 99 LRs issus du croisement entre PAC2 et RHA266, inoculés par différents isolats de *P. macdonaldii*. La variabilité génétique de 60 mutants a été étudiée en utilisant les marqueurs AFLP. Des marqueurs potentiellement associés à la résistance partielle au Phoma ont été identifiés. Les étapes sont les suivantes:

II-6-1-Extraction d'ADN génomique

Les échantillons utilisés sont des disques foliaires prélevés à partir de jeunes feuilles de plantules de tournesol au stade B3-B4 (Annexe 2). Ces disques foliaires sont alors broyés mécaniquement par le broyeur Restch. L'extraction s'effectue ensuite selon la méthode mise au point par Dellaporta et al. (1985) (Annexe 3). L'ADN est séparé des protéines, des pigments chlorophylliens et des débris végétaux par extraction au chloroforme et précipitation à froid par l'éthanol. Les culots obtenus sont séchés et repris dans du Tris-EDTA pH 8 pour être conservés. Après une nuit passée à 4°C, pour que l'ADN soit totalement re-dissout, la qualité d'ADN extrait est déterminée par spectrophotométrie en mesurant l'absorbance à 260 nm (A260). Le degré de contamination de l'ADN par les glucides et les protéines est évalué en contrôlant l'absorbance, respectivement à 230 nm et à 280 nm (Sambrook et al., 1989).

Deux techniques de marquage ont été employées pour le génotypage : AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) et SSRs (Simple Sequence Repeats).

II-6-2-Marquage par la méthode AFLP

Le protocole détaillé concernant l'AFLP est présenté en Annexe 4. Ce processus inclut 5 étapes (Vos et al., 1995). Les étapes du marquage par AFLP sont les suivantes:

II-6-2-1-Digestion de l'ADN

L'ADN extrait a été porté à une concentration de 14ng/μl. 18μl de chaque échantillon ont été prélevés afin d'être digérés par deux enzymes de restriction (Annexe 4). Ces enzymes sont *EcoR1* qui a la propriété de couper au niveau d'un site de restriction à 6 bases (G/AATTC), donc avec une fréquence faible et *Mse1* qui coupe au niveau d'un site de restriction à 4 bases (T/TAA), donc beaucoup plus fréquemment que *EcoR1*. La majorité des fragments d'ADN doivent être inférieurs à 500 paires de base pour une bonne séparation sur gel d'acrylamide.

II-6-2-2-Ligation des adaptateurs

Il s'agit de lier des adaptateurs spécifiques aux sites de restriction des différents fragments obtenus après la digestion. Une solution contenant des adaptateurs est ajoutée à chaque échantillon de la réaction précédente. Ces adaptateurs sont des séquences d'ADN connues, capables de se ligaturer au niveau des extrémités cohésives de chaque fragment grâce à l'action de la ligase (Annexe 4).

II-6-2-3-Préamplification

L'étape de préamplification est une première amplification des trois catégories de fragments d'ADN digérés et ligaturés (*EcoR1-EcoR1*, *EcoR1-Mse1*, *Mse1-Mse1*). Cette amplification est obtenue par PCR en utilisant des amorces ayant des séquences complémentaires à celles des adaptateurs, avec un nucléotide en plus dans le but de préamplifier les fragments d'ADN qui ont la complémentarité avec le nucléotide supplémentaire. 5μl de chaque échantillon dilué 10 fois sont employés, auxquels on ajoute le « mixe » de préamplification contenant les

amorces (Annexe 4). Pour l'amorce complémentaire d'*EcoR1* on ajoute l'adénine et pour l'amorce complémentaire de *Mse1* la cytosine.

II-6-2-4-Amplification sélective

Cette étape est précédée par le marquage de l'amorce *EcoR1* radioactivement par le γ ^{33}P d-[ATP] (Amersham Pharmacia Biotech) grâce à l'action de la T4 Kinase. Il s'agit d'amplifier une seconde fois 2.5 μl de d'ADN digérés, ligaturés et préamplifiés qu'on a dilué 50 fois en utilisant des amorces auxquelles les trois nucléotides sont ajoutés (Annexe 4). Les réactions de préamplification et d'amplification sélective s'effectuent grâce à l'action de la Taq DNA polymerase (Life Technologies) dans le thermocycleur Gene Amp PCR System 9700 (Perkin Elmer Applied Biosystem).

II-6-2-5-Séparation sur gel d'acrylamide

Le système permettant de faire migrer les fragments d'ADN amplifiés est constitué principalement de deux plaques, l'une en verre et l'autre en plastique, entre lesquelles sera coulé le gel d'acrylamide à 6% (38 x 50 cm Sequi-Gen® GT Nucleotide Acide Electrophoresis Cell, Bio-RAD). La plaque en plastique qui a en même temps une cuve dans laquelle sera versée le tampon TBE (Annexe 5) est traitée à l'huile de silicone pour empêcher le gel de coller sur celle-ci. L'ADN est, ensuite mélangé à volume égal avec le tampon de charge (98% formamide, 10mM EDTA, bleu de Bromophénol et xylène Cyanole) (Annexe 5) puis dénaturé pendant 3mn à 95°C. 6 μl de chaque échantillon (représentant une lignée recombinante, une plante F2 ou un parent) sont déposés dans chaque puits du gel. La migration de l'ADN dure environ deux heures, puis le gel est récupéré sur du papier Wattman. Ensuite il est couvert d'un film en plastique pour être séché et placé dans une cassette, avec un film autoradioactif (MP Hyperfilm-Amersham Pharmacia Biotech). Trois jours après, le

film est révélé sous lumière rouge en le plongeant successivement dans une solution de révélateur et de fixateur.

II-6-2-6-Analyse des profils moléculaires

a)Population F2

Le choix des marqueurs destinés à la construction de la carte repose sur les points suivants: (1) un marqueur, par définition, doit être présent chez un seul des deux parents, (2) le marqueur doit être bien visible (présence ou absence) chez les parents et dans une partie des descendants du croisement, (3) la ségrégation d'un marqueur doit être voisine des proportions mendéliennes en F2 (3:1). Ainsi, les trois quarts des génotypes doivent posséder une bande donnée et un quart son absence. Les marqueurs présentant une distorsion de ségrégation ne sont exclus. L'étape suivante consiste à coder la présence de bande par '1' et l'absence par '0'. En second lieu ce codage (1,0) est ensuite transformé en codage (A, B, C et D) de la façon suivante: lorsqu'une bande est présente chez le mâle, la lettre A correspond à l'absence de la bande (0) et la lettre C à sa présence (1). Lorsqu'une bande est présente chez la femelle, la lettre B correspond à l'absence de la bande (0) et la lettre D à sa présence (1). Dans les deux cas, la génotype F2 qui présente une bande peut être homozygote ou hétérozygote pour le marqueur étudié.

b)Population de mutants

A partir des gels obtenus, on détermine les marqueurs polymorphes, c'est-à-dire ceux qui sont présents ou absents chez une partie des mutants et la lignée AS-613. Ces marqueurs sont choisis en fonction de certains critères de sélection: la netteté de la bande, l'intensité et la facilité de la lecture. Chaque mutant est alors identifié par son profil AFLP.

II-6-3-Marquage par la méthode SSR

Nous avons étudié les lignées parentales pour le polymorphisme avec différents marqueurs SSR et les marqueurs présentant un polymorphisme entre les deux parents sont sélectionnés pour l'analyse moléculaire. L'amplification des microsatellites s'effectue selon les méthodes modifiées de Tang et al. (2002) et Paniego et al. (2002). Les microsatellites employés nous ont permis de lier les cartes AC (réalisées à partir des données codées A et C) et BD (réalisées à partir des données codées B et D), et augmenter ainsi le nombre de marqueurs de la carte. Pour la cartographie génétique des SSRs, on utilise les lettres A et B correspondant aux allèles du parent femelle et du parent mâle respectivement et H pour les individus hétérozygote.

II-6-4-Etablissement des cartes génétiques

Le fichier des résultats codés A, B, C et D pour les marqueurs AFLP et A, B et H pour les marqueurs microsatellites est successivement transformé de la forme Excel en forme texte puis en forme *raw*. Après avoir précisé le type d'information, le nombre de génotypes F2 et le nombre de marqueurs en haut du fichier, le logiciel CarthaGene (De Givry et al., 2005) devient ainsi capable de lire les données et de les analyser. Le logiciel utilise la méthode du maximum de vraisemblance pour calculer le pourcentage de recombinaison. Il permet l'analyse des populations en ségrégation, des lignées haploïdes doublées (HD), des populations de backcross (BC) ainsi que les lignées recombinantes (RLs). Ce logiciel est d'accès gratuit via internet.

II-6-5-Identification de marqueurs individuels

L'association entre les marqueurs AFLP et les données de sévérités de la maladie dans la population de mutant a été estimée par l'analyse de régression multiple par étapes, où des

données de sévérités de la maladie ont été traités comme variables dépendantes tandis que les marqueurs d'AFLP étaient traités en tant que variables indépendantes (Vijayan et al., 2006).

II-6-6-Détection des QTLs

La recherche de QTLs a été effectuée grâce au logiciel QTL-Cartographer version 1.16 en utilisant le modèle 6 (CIM: Composit Interval Mapping) (Basten et al., 2002). Ce modèle prend en considération deux paramètres: le nombre de marqueurs qui contrôlent le fond génétique et la taille de la fenêtre qui limite des deux côtés les marqueurs flanquant le site testé. Cette procédure rend l'analyse plus sensible à la présence de QTLs dans l'intervalle ciblé. A chaque intervalle, le degré de signification des associations entre mesures et marqueurs est estimé par le LRS (Likelihood Ratio Statistic) traduit comme le rapport statistique de vraisemblance (Haley & Knott 1992). Ce rapport correspond statistiquement au test χ^2 (Manly & Olson 1999). Dans nos études, le nombre de marqueurs constituant le fond génétique était fixé à 15 ($n_m = 15$) et la taille de la fenêtre à 15 ($w = 15$) pour la recherche de QTLs liés à la résistance partielle au Phoma.

II-7-Analyse de l'expression de gènes de défense

Le profil de 12 gènes potentiellement associés à la résistance partielle du tournesol à *P. macdonaldii* a été testé sur le mutant M6-54-1 et la lignée originelle AS613 inoculés chacun par trois isolats de *P. macdonaldii*, en utilisant la RT-PCR quantitative.

II-7-1-Prélèvement et broyage des pétioles

Les pétioles de cotylédons sont prélevés 48 heures après l'inoculation, congelés dans l'azote liquide et conservés à -80 °C. Ils sont réduits en poudre par microbroyage avant l'extraction d'ARN. Leur congélation doit impérativement être maintenue durant cette étape.

II-7-2-Extraction d'ARN totaux

Le protocole d'extraction mis au point par Verwoerd et al. (1989) a été utilisé (Annexe 6). Après le broyage, 3 ml de tampon d'extraction chaud (65°C) [LiCl 0,1 M, Tris 100 mM pH8, EDTA 10 mM, SDS 1%] et 3 ml phénol sont ajoutés pour 1 g de poudre. Après homogénéisation au vortex, le broyat est traité par 1.5 ml de chloroforme-isoamylalcool (24:1). Une centrifugation de 5 minutes à 10000 g permet de séparer une phase aqueuse d'acides nucléiques. Les surnageants obtenus sont traités par un volume égal de LiCl 4M durant une nuit entière, en chambre froide. Après une centrifugation d'une demie heure à 15000 g, les culots obtenus d'ARN totaux sont resuspendus dans 250 µl d'eau DEPC, en présence de 25 µl de NaOAc 3 M pH 5.2 et de 500 µl d'éthanol absolu. Après une nuit à -80 °C et une centrifugation de 30 minutes à 15000 g, les culots sont lavés à l'éthanol 70° puis resuspendus dans 50 µl d'eau DEPC. La pureté et la qualité des ARN dans les extraits ainsi obtenus sont estimées par mesure de l'absorbance à 260 nm et par électrophorèse sur d'agarose 1.2 %. Il sont conservés à -80°C.

II-7-3-Traitement DNase

Afin d'éliminer toute trace d'ADN dans les préparations d'ARNs, ces dernières sont traitées avec une unité de DNase (référence Promega M610A) pour 10 µg d'acides nucléiques, à 37 °C pendant une demi-heure. La DNase est directement dénaturée par un passage de 10 minutes à 65°C, puis éliminée. Les volumes sont ajustés à 250 µl avec de l'eau DEPC, et traités par 250 µl de phénol–chloroforme–isoamylalcool (25:24:1). Après 10 minutes de centrifugation à 10000 g, la phase aqueuse d'ARN est ajoutée à 300 µl, les tubes sont traités par un volume égal de chloroforme et centrifugés 10 minutes à 10000 g. Les surnageants récupérés sont additionnés de 1/10 ème de volume de NaOAc 3M pH 5.2 et de 2 volumes d'éthanol absolu. Après une nuit à -80°C, les tubes sont centrifugés à 12000 g pendant 30 minutes. Les culots d'ARN sont lavés à l'éthanol 70°, séchés, repris dans 30 µl d'eau DEPC et

conservés à -80°C. Les échantillons sont analysés par spectrophotométrie et migration sur gel d'agrose 1.2 %.

II-7-4-‘Reverse transcription’ des ARNs messagers

Les échantillons sont aliquotés à la même concentration (10µg/µl d'ARN), en suivant les mesures spectrophotométrique. La ‘reverse transcription’ consiste en la synthèse d'une molécule d'ADN complémentaire pour chaque molécule d'ARN messenger, réalisée ici avec le kit BD Biosciences K1402. Deux µl d'oligo-dT (=1 µg) est ajouté à chaque échantillon d'ARN, et l'hybridation se fait à 72°C pendant 10 minutes. Ensuite 16 µl de « mix » RT [tampon 5X – dNTPs 2.5 mM – recombinant RNase inhibitor (40 unités/µl) – MMLV reverse transcriptase (400 unités/µl)] sont ajoutés, la ‘reverse transcription’ s’effectue à 42°C pendant 2 heure puis les brins sont dénaturés 15 minutes à 70°C. La solution d'ADN obtenue est ajustée à 100 µl. Pour chaque échantillon, la proportion d'un messenger va correspondre à la quantité de sonde complémentaire synthétisée.

II-7-5-RT-PCR quantitative

Les amorces spécifiques de gènes ont été fabriquées en utilisant le logiciel 'Primer Express', la version 2.0 (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Pour les amplifications, 1µl d'ADNc, 10 µl de 'SYBER Green Mastermix' (Applied Biosystems), et 300 nM de chacune des 2 amorces sont utilisés dans un volume réactionnel final de 20 µl. Le programme PCR consiste en 2 minutes à 50°C, 10 minutes à 95°C, 40 cycles de [15 seconde à 94°C et 1 minute à 60°C]. Les réactions ont été soumises à une augmentation progressive de température pour créer la courbe de dissociation, qui matérialise les changements de l'intensité de fluorescence en fonction de la température et par laquelle les produits non spécifiques peuvent être détectés. Le programme de dissociation était 15 secondes à 95°C, 15 secondes à 60°C suivies par 20 minutes d'augmentation lente de la température de 60°C à 95°C. Pour analyser les

résultats de la PCR quantitative, nous avons opté pour une méthode qui consiste à quantifier le changement du niveau du gène étudié par rapport à un témoin. Cette quantification du changement relatif de l'expression des gènes est basée sur la méthode du $2^{-\Delta\Delta CT}$ décrite par Livak et Schmittgen (2001). Il s'agit de fixer un seuil Ct (threshold Cycle) correspondant au nombre de cycles pour lequel le signal d'amplification est au dessus du bruit de fond, mais la courbe d'amplification restant en phase exponentielle. La comparaison du Ct du gène par rapport au Ct d'un gène témoin (nous avons utilisé l'*actin*) permet de connaître le niveau d'expression du gène dans les différentes conditions testées.

CHAPITRE III: VARIABILITÉ GÉNÉTIQUE ET HEREDITE DE LA RESISTANCE PARTIELLE AU PHOMA

Introduction

La maladie est le résultat des interactions entre trois éléments, à savoir la plante (hôte), l'agent pathogène et l'environnement. Van Der Plank (1968) a désigné ces interactions hôte/pathogène/environnement sous le nom de triangle de la maladie. La sélection variétal nécessite la connaissance de la variabilité génétique, tant de la résistance chez l'hôte, que de l'agressivité de l'agent pathogène. Ces deux notions doivent donc être soigneusement cernées afin de pouvoir être valablement utilisées.

Une importante variabilité génétique au niveau de la résistance partielle entre les génotypes de tournesol face au Phoma a été démontrée après expérimentations en champs (Pérès et al., 1994) et en conditions contrôlées (Roustae et al., 2000a; Rachid Al-Chaarani et al., 2002; Abou Al Fadil et al., 2004; Bert et al. 2004). Roustae et al. (2000a) par utilisation de génotypes parentaux et leurs hybrides F1, ont montré que la variation observée entre génotypes était due à l'aptitude générale à la combinaison (AGC). De ce fait, la majeure partie de la variabilité est attribuée aux effets additifs des gènes. Une variabilité génétique pour la résistance partielle au Phoma a été également mise en évidence chez des familles F3 issues d'un croisement entre un mutant, partiellement résistant et sa lignée originelle en conditions contrôlées (Abou al Fadil et al., 2004). Des lignées recombinantes issues du croisement entre les génotypes PAC2 et RHA266 ont été inoculées par un isolat français agressif de *P. macdonaldii* et 7 QTLs ont été identifiés (Rachid Al-Chaarani et al., 2002). Ces QTLs permettaient expliquer 92% de la variation phénotypique de la résistance partielle du tournesol. Bert et al. (2004) en utilisant des familles F2-F3 issue d'un croisement entre les génotypes PAZ2 et FU ont mis en évidence 4 QTLs contrôlant la résistance au Phoma. Toutes les études génétiques mentionnées ci-dessus ont été réalisées suite à une inoculation des plantules de tournesol à l'aisselle des pétioles de cotylédons avec un isolat agressif de *P. macdonaldii* (MP6).

D'autre part, une grande variabilité entre des isolats du Phoma au niveau de leur agressivité a été notée (Roustae et al., 2000b; Larfeil, 2003). Étant donné l'importante variabilité du Phoma, notamment au niveau de son agressivité, nous avons voulu déterminer par une étude préliminaire si cette variabilité se concrétisait en présence de l'hôte. Cette première approche pourrait en effet montrer l'éventuelle existence de pathotypes.

La résistance de 184 génotypes de tournesol a été évaluée avec un isolat du *P. macdonaldii* (MP6) en conditions contrôlées, mises au point par Roustae et al. (2000a). Il s'agit de lignées recombinantes (LRs) et leurs lignées parentales (PAC2 et RHA266), d'une population mutante (120 mutants) produits par irradiation gamma à partir de lignée AS613, aussi bien que des génotypes de différentes origines géographiques (Annexe 1). Nous avons identifié des génotypes de différents groupes qui ont montré la résistance partielle à la maladie de taches noires (Annexe 1).

L'interaction 'génotype-isolat' pour la résistance partielle au *P. macdonaldii* chez le tournesol a été déterminée en utilisant 28 génotypes (sélectionnés parmi les 184 génotypes) inoculés par sept isolats de ce pathogène avec différentes agressivités dans des conditions contrôlées. Il s'agit des isolats MA6, MA7, MP3, MP6, MP8, MP10 et MP11. Le matériel végétal utilisé comprend 28 génotypes provenant des lignées recombinantes, des mutants et des génotypes de différentes origines géographiques qui se composent de lignées homozygotes génétiquement éloignées de façon à disposer d'un matériel végétal très différent. Chacune des 28 lignées est contaminée avec chacun des 7 isolats. Les résultats de cette expérimentation sont présentés dans l'article N° 1 (Darvishzadeh et al., 2007a), sous presse dans 'Plant Pathology'.

L'étude du contrôle génétique de la résistance partielle du tournesol aux isolats du Phoma a également été menée suite à une contamination sur pétiole dans un programme de croisements diallèles. L'analyse diallèle, outil performant pour l'analyse génétique de caractères

quantitatifs, a été utilisée au cours de ce travail pour définir les aptitudes générale et spécifique à la combinaison des lignées du tournesol pour la résistance partielle au Phoma. Cinq lignées de tournesol et leurs hybrides F1 ont ainsi été confrontée aux 2 isolats différents de *Phoma macdonaldii*. Les résultats de ce travail sont présentés dans l'article N° 2 (Darvishzadeh & Sarrafi, 2007), accepté pour publication dans 'Plant Breeding'.

Genotype-isolate interaction for resistance to black stem in sunflower (*Helianthus annuus*)

R. Darvishzadeh^a, G. Dechamp-Guillaume^a, T. Hewezi^{ab} and A. Sarrafi^{a*}

^aDepartment of Biotechnology and Plant Breeding, BAP-ENSAT, 18 Chemin de Borde Rouge, BP-32607, 31326 Castanet, France; and

^bDepartment of Plant Pathology, Iowa State University, Ames, IA 50011, USA

Two experiments were undertaken to determine the partial resistance of sunflower genotypes to seven isolates of *Phoma macdonaldii*. In the first experiment, 28 genotypes, including recombinant inbred lines and their parents, M6 mutant lines developed by gamma irradiation, and some genotypes from different geographical origins, were used. The experiment consisted of a split-plot design with three replications, each with 12 seedlings per genotype per isolate, in controlled conditions. Seven days after inoculation, plantlets were scored on a 1–9 scale for percentage necrotic area. Highly significant differences were observed among genotypes, isolates and their interactions. The presence of a differential interaction between genotypes and *P. macdonaldii* isolates was confirmed in a second experiment using 12 genotypes representing large variability for partial resistance to *P. macdonaldii* isolates, as identified in the first experiment. Inbred lines B454/03, ENSAT-B5 and LC1064C were the most susceptible sunflower genotypes, whereas two American lines SDR19 and SDR18 presented high partial resistance to all *P. macdonaldii* isolates studied. The least and most aggressive isolates were MA6 and MP3, respectively. Isolates interacted differentially with sunflower genotypes. This study identified two genotypes (AS613 and PAC2) presenting specific resistance to isolate MP8. The results also showed a wide range of isolate-nonspecific partial resistances among the lines tested. The information presented here could assist sunflower breeders to choose parents of crosses for breeding of durable resistance to phoma black stem disease.

Keywords: black stem, genotype-isolate interaction, partial resistance, *Phoma macdonaldii*, sunflower

Introduction

Black stem, caused by the necrotrophic fungus *Phoma macdonaldii*, is one of the most important diseases of sunflower in the world. It is present in many European countries, including the former Yugoslavia, Italy, Romania and Bulgaria (Acimovic, 1984), China (Hua & Ma, 1996), Australia (Acimovic, 1984; Miric *et al.*, 1999) and the USA (Acimovic, 1984). Black stem is the second-most important sunflower disease in France after downy mildew (Alignan *et al.*, 2006). The disease is characterized mainly by black spots that appear on the stem at the base of leaf petioles and spread along stems. Black stem can occur at any time during the growing season and it is most severe when abundant moisture is available during and after flowering (Gulya *et al.*, 1997). When the disease girdles the stem base, symptoms of premature ripening may occur (Donald *et al.*, 1987; Sackston, 1992), resulting in small heads and seeds, and reducing seed and oil yields (Carson, 1991). Yield losses caused by the disease are

moderate, ranging from 0.2 to 0.7 t ha⁻¹ (Debaeke & Pérès, 2003). Infected plants are weak and more susceptible to lodging (Sackston, 1992).

Utilization of sunflower cultivars with improved partial resistance to phoma black stem in combination with appropriate crop management practices is an effective way to control the disease. Genetic variability for partial resistance to phoma black stem in sunflower was reported in both field (Pérès *et al.*, 1994) and controlled conditions (Roustae *et al.*, 2000a; Rachid Al-Chaarani *et al.*, 2002; Bert *et al.*, 2004). Using parental genotypes and their F₁ hybrids, Roustae *et al.* (2000a) showed that the variation for disease severity score among genotypes studied resulted from the additive and dominant effects of genes controlling black stem partial resistance. In two independent studies under controlled conditions using seedling tests, several quantitative trait loci (QTLs) for partial resistance to phoma black stem were identified (Rachid Al-Chaarani *et al.*, 2002; Bert *et al.*, 2004). All the above-mentioned genetic studies used plant materials inoculated with an aggressive French isolate of *P. macdonaldii* (MP6). Roustae *et al.* (2000b) showed substantial differences among French *P. macdonaldii* isolates for growth rate, pycnidia morphology, pycnidogenesis, pigmentation

*E-mail: sarrafi@ensat.fr

Accepted 24 November 2006

Table 1 Sunflower lines and their country of origin used in experiments for partial resistance to *Phoma macdonaldii* isolates

Sunflower line	Type ^a	Origin	Sunflower line	Type	Origin
C81	RIL	France	SDB1	BL	USA
C43	RIL	France	SDB3	BL	USA
C79	RIL	France	F651/1	BL	Hungary
LR64	RIL	France	F1250/03	BL	Hungary
RHA266	BL	USA	B454/03	BL	Hungary
PAC2	BL	France	ENSAT-B5	BL	France
M6-54-1	M	France	H565R	BL	France
M6-133-2	M	France	ENSAT-R5	BL	France
M6-85-3	M	France	H543R	BL	France
M6-894-2	M	France	RT931	BL	France
AS613	BL	France	AS5305	BL	France
RHA274	BL	USA	ENSAT-R4	BL	France
SDR18	BL	USA	ENSAT-B4	BL	France
SDR19	BL	USA	LC1064C	BL	France

^aBL, breeder's line; RIL, recombinant inbred line; M, gamma-irradiation-induced mutant line.

and aggressiveness. The high genetic variability for pathogenicity in *P. macdonaldii* requires simultaneous incorporation of several genes for resistance to remain effective in cultivars used over a large area. The lack of information on the interactions between resistance genes and pathogen populations places a limitation on the effective deployment of resistance. This paper reports the results of experiments on partial resistance of some sunflower lines to different *P. macdonaldii* isolates.

Materials and methods

Sunflower genotypes

Twenty-eight sunflower genotypes were selected on the basis of their agricultural characteristics and levels of susceptibility to *P. macdonaldii* (Table 1). Recombinant inbred lines (RILs) derived from a cross between PAC-2 and RHA266 were selected for their high partial resistance to the MP6 isolate of *P. macdonaldii* (Rachid Al-Chaarani *et al.*, 2002). Mutant lines were developed by irradiation of the AS 613 genotype with gamma rays and advanced by modified single-seed descent (SSD) with no prior selection for resistance to the disease (Sarraf *et al.*, 2000). A population of 120 mutant lines (M6) was evaluated against *P. macdonaldii* isolate MP6 in controlled conditions.

Several mutants were identified that consistently showed altered black stem resistance and four of them were used in this investigation. Other genotypes used in this study were inbred lines introduced from the United States Department of Agriculture (USDA) and Hungarian and French seed companies, or pure lines from the department where this study was carried out.

Fungal isolates

Seven *P. macdonaldii* isolates were used for inoculation (Table 2). Six of these were collected from different regions in France; their characteristics were previously described by Roustaee *et al.* (2000b). The seventh isolate, MP11, was obtained from stem lesions in sunflower fields in Godolos, Hungary. Stem fragments showing characteristic symptoms were cut into 5 × 5-mm pieces, surface-sterilized for 5 min in a sodium hypochlorite solution (6 chlorometric degrees), washed three times (5 min) in sterile distilled water, transferred to Petri dishes containing potato dextrose agar (PDA, 39 g L⁻¹) and incubated for 10 days at 25 ± 1°C in the dark to allow mycelial growth. The dishes were incubated for a further 10 days under alternating periods of illumination (12 h, 37 µEm⁻² s⁻¹; Philips TLD 15W, 33 lamps) and darkness. Single-pycnidiospore cultures were prepared by serial dilutions (Roustaee *et al.*, 2000b) and maintained on PDA for further subculture. Conservation of isolates was achieved using the method described by Roustaee *et al.* (2000b). A healthy sunflower stem fragment, sterilized at 110°C for 25 min, was placed on a culture of an isolate (from a single spore) on PDA. Pycnidia were visible on the stem fragment after incubation for 15 days at 25 ± 1°C under alternating 12-h periods of illumination (37 µEm⁻² s⁻¹) and darkness. When these fructifications developed, the stem fragment was placed in a sterile haemolysis tube. Tubes were closed with an absorbent cotton plug, covered with aluminium foil and kept in the dark at 4°C.

Experimental design

First experiment

The responses of 28 sunflower genotypes were evaluated with the seven isolates of *P. macdonaldii* under controlled conditions [14-h photoperiod and 25 ± 1°C/18 ± 1°C light/dark temperature, with a light intensity of 200 µEm⁻² s⁻¹ provided by NAV-T 600W lamps (Osram-Vialox), under 75–80% relative humidity]. The experiment was designed as

Isolates	Year of collection	Country of origin	Locality
MP3	1996	France	Tour de Faure
MP6	1996	France	Castanet
MP8	1996	France	Saint Lys
MP10	1996	France	Il de France (Saint Patus)
MA6	1997	France	Saint Lys
MA7	1997	France	Castanet
MP11	2003	Hungary	Godolos

Table 2 *Phoma macdonaldii* isolates used in partial resistance experiments

a split plot with three blocks. Main plots were *P. macdonaldii* isolates and subplots were sunflower genotypes. Each subplot consisted of 12 plantlets of each genotype per replication. Seeds were sterilized for 5 min in a sodium hypochlorite solution (6 chlorometric degrees) and washed in sterile distilled water. Two rows of six seeds per genotype per replication were sown in plastic containers filled with horticultural substrate (Hawita Flor) and transferred to the growth chamber. *Phoma macdonaldii* isolates were separately grown on PDA medium at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ with a 12-h photoperiod ($37 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$). After a 10- to 12-day incubation period, pycnidiospore suspension was obtained by the addition of sterile water to the surface of each culture and mechanical mixing. Twenty microlitres of spore suspension containing 10^6 pycnidiospores mL^{-1} in water, 0.5% orange juice and 0.25% gelatine were deposited at the intersection of the cotyledon petiole and hypocotyl of two-leaf-stage sunflower plantlets. During the first 48 h following inoculation, plantlets were covered with a transparent cover (Plexiglas) to maintain nearly saturated humidity, favourable for fungal development. Both cotyledon petioles of each plantlet were scored 7 days after inoculation according to the percentage of the petiole area exhibiting disease symptoms. A score of 1 (resistant) to 9 (susceptible) was given in relation to the proportion of petiole area showing necrosis, as proposed by Roustaei *et al.* (2000a), where: 1 = 0–5%, 2 = 6–10%, 3 = 11–20%, 4 = 21–30%, 5 = 31–40%, 6 = 41–60%, 7 = 61–80%, 8 = 81–99% and 9 = 100%, with necrosis spreading down the stem.

Second experiment

Twelve sunflower genotypes identified in the first experiment as representing extensive variability for partial resistance and susceptibility to *P. macdonaldii* isolates were sown and inoculated with the same *P. macdonaldii* isolates. The experimental design and pathogen inoculation were the same as for the first experiment.

Statistical analysis

Analysis of variance was performed for the first experiment, as well as for the 12 genotypes used in both experiments, using the general linear model (GLM) procedure in the SAS software (SAS Institute). The main effects of genotypes and isolates, as well as their interactions, were determined.

Specific interactions between genotypes and isolates were identified by a robust statistical technique, median polish (Tukey, 1977; Arraiano & Brown, 2006). Median polish was used to fit an additive model of genotype plus isolate to the mean disease severity score for each genotype-isolate pair. Median polish operated by iteratively calculating the median scores for the isolates across the set of genotypes and those for the genotypes across the set of isolates. If there was no 'genotype \times isolate' interaction, residuals of the observed mean disease severity score from the genotype-plus-isolate additive model fitted by median polish were normally distributed. On the other hand, a median polish residual for a genotype-isolate pair which was an outlier

from a normal distribution, indicated that the genotype was specially resistance to the isolate if the residual was negative, or susceptible if it was positive. A negative outlier indicated that the amount of disease caused by an isolate on a genotype was exceptionally low considering the median amount of disease caused by all seven isolate on that host genotype and the median disease caused by that isolate on all 28 genotypes. Combinations of genotypes and isolates were not replicated equally, so the median polish residual for each genotype-isolate pair was multiplied by the square root of the number of plantlets scored, to ensure that all residuals, with the exception of outliers, were sampled from a single normal distribution (Chartrain *et al.*, 2004). The statistical significance of the deviation of the median polish residual from a normal distribution was tested by Grubbs' method (Sokal & Rohlf, 1981; Brown *et al.*, 2001). This part of the analysis was completed using Microsoft EXCEL 2002.

Results

The main effects of genotypes, isolates and their interactions were highly significant in both experiments, whereas the main effect of experiment and the interactions between experiments and other sources of variation were not significant (Table 3). Median disease severity scores across isolates for each genotype and across genotypes for each isolate were calculated omitting data for isolates with which the genotypes had specific interactions. These medians therefore reflected the general level of susceptibility of a genotype to the isolates tested, as well as the general aggressiveness of an isolate to the genotypes tested. The inbred sunflower lines B454/03, ENSAT-B5 and LC1064C were the most susceptible genotypes, showing high susceptibility to all isolates tested (Table 4). The most resistant genotypes were the two American lines SDR19 and SDR18, followed by RIL-C81 and RHA274/R, in which no specific resistance was identified (Table 4). SDR18 and SDR19 showed good partial resistance to all isolates tested.

Isolates also showed differences in their aggressiveness for the 28 genotypes tested. MP3 was the most aggressive isolate and MA6 showed the lowest level of aggressiveness (Table 4). Isolate genotype interacted differentially with host genotype. MP8 was the only isolate for which two sunflower genotypes with specific resistance were identified. AS613 and PAC2, which are recognized as sources of specific resistance to isolate MP8, were more susceptible to most other isolates. RIL-C81 was identified as specifically susceptible to isolate MP11. This line had good partial resistance to most isolates tested, except MA7 (Table 4).

Discussion

Scoring the damage caused by the pathogen in naturally infected genotypes under field conditions can be reliable, but it is not always possible to expose plants to the pathogen evenly and so achieve uniform infection. Homogeneous infection of each genotype is essential for the precise

Table 3 Analysis of variance for disease severity score in sunflower genotypes infected by *Phoma macdonaldii* isolates in two experiments

Experiment I			Experiment II		
Source of variation	d.f. ^a	MS ^b	Source of variation	d.f.	MS
Genotype	27	44.30***	Genotype	11	128.82***
Isolate	6	21.51***	Isolate	6	20.49***
			Experiment	1	1.78 ^{ns}
Genotype × isolate	162	5.71***	Genotype × isolate	66	14.24***
			Genotype × experiment	11	0.49 ^{ns}
			Isolate × experiment	6	0.34 ^{ns}
			Genotype × isolate × experiment	66	0.20 ^{ns}
Replication	2	2.07 ^{ns}	Replication (experiment)	4	0.67 ^{ns}
Replication × isolate	12	1.95	Replication × isolate (experiment)	24	0.65
Residual	378	0.56	Residual	308	0.56

Coefficients of variation were 15.00% and 15.53% for experiments I and II, respectively.

^ad.f. = degrees of freedom.

^bMS = mean of squares.

*** = Significant at 0.001 probability level; n.s. = non significant.

Table 4 Mean disease severity score^a of 28 sunflower genotypes inoculated with seven *Phoma macdonaldii* isolates under controlled conditions

Sunflower genotype	MA6	MA7	MP10	MP11	MP3	MP6	MP8	Median ^b
AS5305	4.19	6.15	6.83	4.34	8.15	4.70	4.74	4.87
AS613	6.74	7.57	3.63	4.01	6.80	7.37	2.24 (-4.42)^c	6.79
B454/03	7.77	7.42	7.27	7.60	7.71	7.46	7.28	7.40
ENSAT-B4	7.62	6.96	5.83	6.33	7.19	6.83	7.33	6.80
ENSAT-B5	6.78	6.72	7.50	6.25	7.54	7.41	7.76	7.21
ENSAT-R4	3.14	3.59	3.94	3.92	7.70	2.20	5.58	3.89
ENSAT-R5	2.21	4.81	7.00	3.72	4.05	2.10	1.71	3.66
F1250/03	2.88	5.01	3.73	5.97	5.82	2.13	2.15	3.68
F651/1	3.60	7.13	5.25	3.61	5.95	6.72	5.43	5.56
H543R	1.56	3.08	4.03	3.34	6.99	6.15	3.89	3.98
H565R	7.40	4.66	7.16	6.36	7.10	7.40	5.44	6.71
LC1064C	6.81	7.35	7.44	7.14	7.59	6.13	6.43	7.20
M6-133-2	5.27	4.77	6.52	4.28	3.72	5.44	5.90	5.39
M6-54-1	1.24	4.07	2.21	6.88	5.96	2.78	6.46	3.91
M6-85-3	7.16	7.62	6.99	6.94	5.83	6.21	6.85	6.98
M6-894-2	6.87	6.54	6.27	5.27	7.63	7.52	6.64	6.77
PAC2	5.14	6.71	7.10	5.83	7.55	6.92	2.38 (-4.20)	6.71
RHA266	2.48	6.00	3.04	4.31	3.71	6.06	6.33	4.66
RHA274/R	1.12	6.15	2.90	3.55	2.67	3.78	2.21	2.85
RIL-C43	3.76	4.80	5.43	3.23	6.94	4.07	1.88	4.19
RIL-C79	4.60	6.19	7.06	3.65	7.88	5.97	4.53	5.92
RIL-C81	2.32	5.40	1.57	<i>6.96 (4.50)^{c,d}</i>	3.27	3.28	1.20	2.81
RIL-LR64	6.94	5.11	5.25	3.68	2.22	7.19	1.64	4.95
RT931	3.24	5.39	5.68	5.14	3.70	4.66	4.36	4.61
SDB1	4.02	5.29	4.90	4.24	4.48	3.10	4.32	4.45
SDB3	4.37	3.71	6.48	4.05	4.98	5.71	4.15	4.59
SDR18	1.77	1.90	1.32	3.85	2.49	2.05	1.89	2.02
SDR19	2.15	2.49	2.56	2.52	2.81	3.08	2.06	2.50
Overall median	4.82	5.41	5.31	4.90	5.64	5.30	5.12	

^aMeans estimated by general linear modelling.

^bMedians for each genotype calculated from mean scores with seven isolates, omitting any isolate for which the 'genotype × isolate' interaction effect was significant ($P = 0.05$) in the median polish (MP) analysis.

^cItalics indicate specific susceptibility.

^dRound brackets indicate residuals (difference of observed and fitted values) for statistically significant interactions ($P = 0.05$) in MP analysis. A larger negative residual indicates greater isolate-specific resistance and a positive residual indicates isolate-specific susceptibility.

^eBold type indicates specific resistance of genotype to an isolate ($P = 0.05$ in MP analysis).

identification of the level of susceptibility for each inbred genotype. For this reason, the artificial inoculation method developed by Roustae *et al.* (2000a) was used in the present studies. The seedling petiole test used in this study allowed the inoculum load per plant to be controlled, thus minimizing the number of plants escaping infection and consequently reducing the potential for false negatives, as up to now reports on black stem resistance in sunflower indicate the lack of full resistance in cultivated sunflower (Roustae *et al.*, 2000a; Debaeke & Pérès, 2003). Moreover, all plantlets with no visible lesion on the petiole were defined as not infected, and excluded from the present experiments. Roustae *et al.* (2000a) reported that the disease severity score at the seedling stage was the same as that at the adult plant stage.

Genotypes used in this study differed considerably for black stem resistance (Table 4). Among 28 sunflower genotypes used in the experiments, three lines, B454/03, ENSAT-B5 and LC1064C, were susceptible to all isolates of *P. macdonaldii*, whereas two American lines, SDR18 and SDR19, showed partial resistance to all *P. macdonaldii* isolates (Table 4). Other genotypes showed intermediate responses across *P. macdonaldii* isolates (Table 4). These results confirm the genetic variability for partial resistance to phoma black stem that was previously reported in both field (Pérès *et al.*, 1994) and controlled conditions (Roustae *et al.*, 2000a; Rachid Al-Chaarani *et al.*, 2002; Abou Al Fadil *et al.*, 2004; Bert *et al.*, 2004).

This study showed significant differences in aggressiveness among isolates of *P. macdonaldii* (median ranged from 4.82 to 5.64). The least and most aggressive isolates were MA6 and MP3, respectively (Table 4). This variation can be attributed predominantly to genetic causes. In this study the infection of plants at the same growth developmental stage, grown under similar conditions, helped to minimize the influence of environmental factors. The constancy of ranking of isolates over the two experiments in this study provides further strong evidence for this claim. Similar variation in aggressiveness was demonstrated among isolates of *P. macdonaldii* originating from different geographical locations based on pathogenicity tests on cotyledon petioles (Roustae *et al.*, 2000b; Larfeil *et al.*, 2002).

The results provide strong indications of the existence of specificity between *P. macdonaldii* isolates and sunflower genotypes for partial resistance. The presence of differential interaction between sunflower genotypes and *P. macdonaldii* isolates was confirmed in the second experiment using a genetically diverse group of genotypes (Table 3). These results are in agreement with those of Larfeil *et al.* (2002), who also found large differences between French *P. macdonaldii* isolates and those of other countries in response to sunflower genotypes for partial resistance to black stem infection. The median polish analysis allowed individual interactions to be identified clearly. Two genotypes (AS613 and PAC2) presenting specific resistance to isolate MP8 were identified (Table 4). Specific interactions can be used to postulate the presence of resistance genes that operate partially in compatible

interactions as the percentage of petiole area exhibiting disease symptoms (necrosis) in partially compatible interactions (partially resistant genotypes) corresponds to a very localized necrosis and not to a hypersensitive response, as it spreads slightly with time. Zenbayashi-Sawata *et al.* (2005) reported a new gene-for-gene relationship between a partial resistance gene in rice and a gene for aggressiveness in the fungus *Magnaporthe grisea*. They concluded that the gene-for-gene relationship between host and pathogen might operate not only for complete resistance, as expressed in incompatible combinations, but also for partial resistance in compatible interactions. In the present experiments AS613 and PAC2 did not show good levels of resistance across the isolates tested, whereas they were resistant to isolate MP8 (Table 4). This indicates that field resistance to phoma black stem in these genotypes may be controlled by isolate-specific partial resistance genes rather than by isolate-nonspecific partial resistance genes. The list of isolate-specific interactions identified here is not necessarily exhaustive. The statistical methods used identified outliers, so that for each isolate a line with a score that contrasted with those of other lines was identified as significant and, similarly for each line, a response to an isolate which contrasted with the responses to other isolates was identified as significant. However, if a line was resistant to all isolates no interaction could be detected, and if one isolate had low aggressiveness on all lines tested no interaction could be detected either. SDR18 and SDR19, the most resistant lines, had high partial resistance to all isolates (Table 4), but the possibility that they had weak specific resistance to all seven isolates cannot be excluded. RIL-C81 was especially susceptible to isolate MP11, but it was the most resistant genotype overall. This genotype probably lacks a gene carried by the majority of genotypes that confers resistance to isolate MP11.

'Genotype-isolate' interactions for partial resistance were also observed in other pathosystems, such as sunflower-*Phomopsis* (Viguié *et al.*, 1999), potato late blight (Flier *et al.*, 2003), rice leaf blast (Zenbayashi-Sawata *et al.*, 2002), wheat leaf rust (Broers, 1989) and dry bean anthracnose (Havey *et al.*, 1988).

In this study, mutant line M6-54-1 showed strongly enhanced partial resistance towards three *P. macdonaldii* isolates (MA6, MP10 and MP6) compared to the original line AS613 (Table 4). This might have been caused by the lack of some susceptibility factors in the mutant line. The same mutant line also possessed enhanced susceptibility for a further fungal isolate (MP8) to which the parental line was partially resistant (Table 4). Plant resistance towards a pathogen is often correlated to receptor-mediated perception of the pathogen, which triggers a fast and efficient defence response in the host (Montesano *et al.*, 2003). A possible hypothesis to explain the phenotype of mutant M6-54-1 is that a mutation modified a putative receptor involved in resistance towards isolates MA6, MP10 and MP6. This modification would have changed ligand specificity so that these three isolates were more readily perceived, but MP8 was not. It would be interesting

to further identify the mutation and the genes responsible for resistance to these isolates.

Recombinant inbred lines (RILs) used in the present study showed different reactions to seven isolates of *P. macdonaldii* when compared with their parental lines (PAC2 and RHA266) (Table 4). This is in agreement with the work of Bert *et al.* (2004), who observed that the susceptibility of sunflower genotypes in F_3 families infected by an isolate of *P. macdonaldii* varied in both directions when compared with their parents. This phenomenon, considered as transgressive segregation, is the result of accumulation of alleles with positive or negative additive effects in the offspring (Zhang *et al.*, 2001).

The isolate-specific and -nonspecific partial resistance genotypes identified in these experiments should be used in crossing programmes for breeding of durable resistance to phoma black stem disease.

Acknowledgements

The authors thank Dr James Brown (John Innes Centre, UK) for statistical analysis and Dr Catherine Carter (South Dakota State University, USA) for reading and correcting the manuscript.

References

- Abou Al Fadil T, Dechamp-Guillaume G, Poormohammad Kiani S, Sarrafi A, 2004. Genetic variability and heritability for resistance to black stem (*Phoma macdonaldii*) in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Journal of Genetics and Breeding* 58, 323–8.
- Acimovic M, 1984. Sunflower diseases in Europe, the United States and Australia. *Helia* 7, 45–54.
- Alignan M, Hewezi T, Petitprez M, Dechamp-Guillaume G, Gentzbittel L, 2006. A cDNA microarray approach to decipher sunflower (*Helianthus annuus* L.) responses to the necrotrophic fungus *Phoma macdonaldii*. *New Phytologist* 170, 523–36.
- Arraiano LS, Brown JKM, 2006. Identification of isolate-specific and partial resistance to septoria tritici blotch in 238 European wheat cultivars and breeding lines. *Plant Pathology* 55, 726–38.
- Bert P-F, Dechamp-Guillaume G, Serre F, Jouan I, Tourvieille de Labrouhe D, Nicolas P, Vear F, 2004. Comparative genetic analysis of quantitative traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.) 3. Characterisation of QTL involved in resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Phoma macdonaldii*. *Theoretical and Applied Genetics* 109, 865–74.
- Broers LHM, 1989. Partial resistance to wheat leaf rust in 18 spring wheat cultivars. *Euphytica* 44, 247–58.
- Brown JKM, Kema GHJ, Forrer HR *et al.*, 2001. Resistance of wheat cultivars and breeding lines to septoria tritici blotch caused by isolates of *Mycosphaerella graminicola* in field trials. *Plant Pathology* 50, 325–38.
- Carson ML, 1991. Relationship between Phoma black stem severity and yield losses in hybrid sunflower. *Plant Disease* 75, 1150–3.
- Chartrain L, Brading PA, Makepeace JC, Brown JKM, 2004. Sources of resistance to septoria tritici blotch and implications for wheat breeding. *Plant Pathology* 53, 454–60.
- Debaeke P, Pérès A, 2003. Influence of sunflower (*Helianthus annuus* L.) crop management on phoma black stem (*Phoma macdonaldii* Boerema). *Crop Protection* 22, 741–52.
- Donald PA, Venette JR, Gulya TJ, 1987. Relationship between *Phoma macdonaldii* and premature death of sunflower. *Plant Disease* 71, 466–8.
- Flier WG, van den Bosch GBM, Turkensteen LJ, 2003. Stability of partial resistance in potato cultivars exposed to aggressive strains of *Phytophthora infestans*. *Plant Pathology* 52, 326–37.
- Gulya T, Rashid KY, Masirevic SM, 1997. Sunflower disease: phoma black stem. In: Schneiter AA, ed. *Sunflower Technology and Production*. Madison, WI, USA: ASA, CSSA, SSSA: Agronomy Monograph no. 35, 319–22.
- Havey MJ, Faria JC, Maxwell DP, Hagedorn DJ, 1988. Partial resistance to anthracnose in Brazilian land races of dry beans shows race specificity. *Euphytica* 44, 167–74.
- Hua Z, Ma G, 1996. A review of sunflower diseases research of China. In: *Proceedings of the 14th International Sunflower Conference, Beijing, China*. Shenyang, China: Academy of Agricultural Science, 754–9.
- Larfeil C, Dechamps-Guillaume G, Barrault G, 2002. *Phoma macdonaldii* Boerema-*Helianthus annuus* L. interaction. *Helia* 36, 153–60.
- Miric E, Aitken EAB, Goulter KC, 1999. Identification in Australia of the quarantine pathogen of sunflower *Phoma macdonaldii* (telomorph: *Leptosphaeria lindquistii*). *Australian Journal of Agricultural Research* 50, 325–32.
- Montesano M, Brader G, Palva ET, 2003. Pathogen derived elicitors: searching for receptors in plants. *Molecular Plant Pathology* 4, 73–9.
- Pérès A, Allard AM, Deverchère J, Penaud A, 1994. Phoma du tournesol: étude de la protection fongicide au champ. In: *Proceedings of the 4th International Conference on Plant Disease, Bordeaux, France*. 1179–85.
- Rachid Al-Chaarani G, Roustace A, Gentzbittel L, Mokrani L, Barrault G, Dechamp-Guillaume G, Sarrafi A, 2002. A QTL analysis of sunflower partial resistance to downy mildew (*Plasmopara halstedii*) and black stem (*Phoma macdonaldii*) by the use of recombinant inbred lines (RILs). *Theoretical and Applied Genetics* 104, 490–6.
- Roustace A, Barrault G, Dechamps-Guillaume G, Lesigne P, Sarrafi A, 2000a. Inheritance of partial resistance to black stem (*Phoma macdonaldii*) in sunflower. *Plant Pathology* 49, 396–401.
- Roustace A, Costes D, Dechamp-Guillaume G, Barrault G, 2000b. Phenotypic variability of *Leptosphaeria lindquistii* (anamorph: *Phoma macdonaldii*), a fungal pathogen of sunflower. *Plant Pathology* 49, 227–34.
- Sackston WE, 1992. On a treadmill: breeding sunflower for resistance to disease. *Annual Review of Phytopathology* 30, 529–51.
- Sarrafi A, Kayyal H, Rachid Al-Chaarani G, Cantin F, Chaline AS, Durielle AS, 2000. Inheritance of organogenesis parameters in cotyledons of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Journal of Genetics and Breeding* 54, 227–31.
- Sokal RR, Rohlf JF, 1981. *Biometry*, 2nd edn. New York, USA: W. H. Freeman.
- Tukey JW, 1977. *Explanatory Data Analysis*. Reading, MA, USA: Addison-Wesley.
- Viguié A, Vear F, Tourvieille de Labrouhe D, 1999. Interactions between French isolates of *Phomopsis/Diaporthe helianthi*

- Munt.-Cvet. *et al.* and sunflower (*Helianthus annuus* L.) genotypes. *European Journal of Plant Pathology* 105, 693–702.
- Zenbayashi-Sawata K, Ashizawa T, Koizumi S, 2002. Mapping of QTL (quantitative trait locus) conferring partial resistance to leaf blast in rice cultivar Chubu 32. *Theoretical and Applied Genetics* 104, 547–52.
- Zenbayashi-Sawata K, Ashizawa T, Koizumi S, 2005. *Pi34-AVRPi34*: a new gene-for-gene interaction for partial resistance in rice to blast caused by *Magnaporthe grisea*. *Journal of General Plant Pathology* 71, 395–401.
- Zhang ZJ, Yang GH, Li GH, Jin SL, Yang XB, 2001. Transgressive segregation, heritability, and number of genes controlling durable resistance to stripe rust in one Chinese and two Italian wheat cultivars. *Phytopathology* 91, 680–6.

Short Communication

Genetic analysis of partial resistance to black stem (*Phoma macdonaldii*) in sunflower as measured by a seedling test

R. DARVISHZADEH¹ and A. SARRAFI^{1,2}

¹Laboratoire de Biotechnologie et Amélioration des Plantes (BAP), INP-ENSAT, 18 Chemin de Borde Rouge, BP 32607, F-31326 Castanet-Tolosan, France; ²Corresponding author, E-mail: Sarrafi@ensat.fr

With 2 tables

Received March 17, 2006/Accepted November 15, 2006

Communicated by W. Friedt

Abstract

Phoma black stem caused by *Phoma macdonaldii* is one of the most important diseases of sunflower in France. To determine the inheritance of partial resistance to the disease, five sunflower genotypes with a wide range of genetic variability for partial resistance were crossed in diallel fashion. Resistance was measured as reaction of seedlings to infection by *P. macdonaldii*. Two separate experiments were undertaken in a controlled growth chamber. In each experiment the parental genotypes and their F₁ hybrids were inoculated by one of the two selected isolates (MP8 and MP10). Analysis of variance for each of two isolates showed significant variability among parents and F₁ hybrids for disease severity score. Combined analysis of variance detected significant interactions between sunflower genotypes and Phoma isolates, suggesting that partial resistance to Phoma black stem should be isolate-specific. General and specific combining ability effects for resistance to Phoma black stem were highly significant for each of the two isolates, indicating that both kinds of gene effect were important in controlling the inheritance of partial resistance to Phoma black stem. On the basis of the results from this seedling test, the cross between M6-54-1 and ENSAT-R5 genotypes, which are the best general combiners for MP8 and MP10, respectively, could be of value in improving black stem partial resistance to these *P. macdonaldii* isolates.

Key words: *Helianthus annuus* — black stem — combining abilities — genotype isolate interaction — partial resistance

Phoma black stem caused by *Phoma macdonaldii* is one of the most important diseases of sunflower in France (Debaeke and Pérès 2003). The disease is characterized mainly by black spots that appear on the stem at the base of leaf petioles and spread along stems. Black stem can occur at any time during the growing season, but is most common after flowering and the disease is most severe when abundant moisture is available during and after flowering. When Phoma girdles the stem base, symptoms of premature ripening may occur (Donald et al. 1987) resulting in small heads and seeds that are empty or in completely filled, reducing seed and oil yields (Carson 1991). Yield losses because of early plant senescence are moderate, ranging from 0.2 to 0.7 t/ha (Debaeke and Pérès 2003). Infected plants are weak and may be more susceptible to lodging (Sackston 1992). Utilization of sunflower cultivars with improved Phoma black stem partial resistance is an effective way to control the disease (Roustae et al. 2000a). Genetic variability for partial resistance to Phoma black stem in sunflower has been reported in both field (Pérès et al. 1994)

and controlled conditions (Roustae et al. 2000a, Rachid Al-Chaarani et al. 2002, Bert et al. 2004). Roustae et al. (2000a) using parental genotypes and their F₁ hybrids showed that the variation of reaction to the seedling test among genotypes studied is due to the additive and dominant effects of genes controlling black stem partial resistance. Recombinant inbred lines derived from a cross between PAC2 and RHA266 genotypes were inoculated by an aggressive French isolate of Phoma black stem and seven quantitative trait loci (QTLs) were identified (Rachid Al-Chaarani et al. 2002). The QTLs detected together explained 92% of the phenotypic variation of the trait. Bert et al. (2004) using F₂-F₃ families derived from a cross between PAZ2 and FU genotypes detected four QTLs, which explained 36% of phenotypic variation. All the above-mentioned genetic studies have been made using plant materials inoculated by an aggressive French isolate of *P. macdonaldii* (MP6). The narrow use of resistance sources may become problematic in the future, assuming that the pathogen contains genetic variability within its natural population. As differences in aggressiveness have been detected among French Phoma isolates (Roustae et al. 2000b), studies on interaction between host and pathogen genotypes are important for durable resistance-breeding. General and specific combining ability (SCA) effects for resistance would potentially lead to more efficient development of resistant cultivars and germplasm resources. The objectives of this study were to determine the genetic variation of sunflower genotypes for partial resistance to Phoma isolates and to estimate the combining abilities for genotypes exhibiting various levels of resistance to two Phoma isolates.

Plant materials: Five genotypes of sunflower (*Helianthus annuus* L.), out of 28 investigated in previous experiments, were selected for this study. These genotypes were grown and crossed in a diallel mating system without reciprocals to produce 10 F₁ hybrid combinations. M6-54-1 is one of the mutant lines developed by seed irradiation of AS 613 genotype with gamma rays following single seed descent programme (Sarraf et al. 2000). ENSAT-B5 and ENSAT-R5 are inbred lines selected in crossing programmes. B454/03 and SDR18 are inbred lines introduced from Hungary and the United States Department of Agriculture, respectively.

Fungal isolates: Two single pycnidiospore isolates of *P. macdonaldii*, namely MP8 and MP10 selected through purified isolates were used in this study. The isolates were collected from different regions of France

and showed high variability for growth rate, pigmentation, pycnidogenesis and aggressiveness in a previous study (Roustaei et al. 2000b). The isolates were grown on Potato Dextrose Agar medium at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ in 12-h photoperiod ($37 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$). After a 10-day incubation period, a pycniospore suspension was obtained by the addition of sterile water to the surface of the culture and by mechanical mixing.

Experimental design: The response of parental genotypes and their F_1 hybrids were evaluated in two separate experiments. In each experiment plantlets were inoculated by one of the two selected isolates (MP8 and MP10) using the seedling test developed by Roustaei et al. (2000a). The experimental design was a randomized complete block with three replications. Each replicate consisted of 10 plantlets of each genotype. Seeds of sunflower genotypes were sterilized for 5 min in a sodium hypochlorite solution (six chlorometric degrees) and washed in sterile distilled water. Two rows of five seeds per genotype per replication were sown in plastic containers filled with horticulture substrate (Hawita Flor, Germany; <http://www.hawita-gruppe.de/>) and transferred to a growth chamber in a 14-h photoperiod and $25 \pm 1/18 \pm 1^\circ\text{C}$ light/dark temperature with a light intensity of $200 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ provided by NAV-T 600 W lamps Osram-Vialox, Molsheim, France under 75–80% relative humidity. Twenty microlitres of spore suspension containing 10^6 pycniospores/ml in water, 0.5% orange juice and 0.25% gelatin were deposited at the intersection of the cotyledon petiole and the hypocotyl of two-leaf-stage plantlets. During the first 48 h following contamination, a transparent cover (Plexiglas) was placed over the containers to maintain nearly saturated humidity, favourable for fungal development. Both cotyledon petioles of the plantlets were scored 7 days after inoculation for the percentage of petiole area exhibiting disease symptoms (necrosis). Scores ranged from 1 (resistant) to 9 (susceptible) in relation to the proportion of petiole area showing necrosis as proposed by Roustaei et al. (2000a) where: 1 = 0–5%, 2 = 6–10%, 3 = 11–20%, 4 = 21–30%, 5 = 31–40%, 6 = 41–60%, 7 = 61–80%, 8 = 81–99% and 9 = 100%, with necrosis spreading down the stem.

Statistical analysis: Analysis of variance was performed using the general linear model procedure in the SAS software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Diallel analyses were conducted according to Griffing's method 2 and model 1 (Griffing 1956) using the SAS program for Griffing's diallel analysis (Zhang et al. 2005). The statistical model is the following:

$$Y_{ij} = \mu + \lambda_i + \lambda_j + s_{ij} + e_{ij},$$

where μ is the general mean effect; λ_i (λ_j) is the general combining ability (GCA) of the i th (j th) parent; s_{ij} is the specific combining ability of the cross between the i th and j th parent and e_{ij} is residual.

The hypothesis that GCA estimates of the parents equalled zero was tested by a two-tailed t -test. The Newman-Keuls test was used for comparing mean performance of parents and F_1 s.

Analysis of variance for each of two isolates showed significant variability among parents and F_1 hybrids for seedling disease severity scores, indicating that partial resistance to *Phoma* black stem isolates is genetically controlled in the genotypes tested (Table 1). Mean disease severity scores, summarized in Table 2, showed large differences among parental lines studied for partial resistance to black stem. ENSAT-B5 and B454/03 were susceptible to both isolates whereas SDR18 showed partial resistance to both of them. Two other lines showed contrast reactions to the isolates. M6-54-1 was susceptible to MP8 but highly resistant to MP10 whereas ENSAT-R5 was susceptible to MP10 and resistant to MP8. F_1 hybrids presented a continuous range of susceptibility from partial resistance to high susceptibility (Table 2). Mean square values of GCA and SCA were significant for both isolates (Table 1). The estimates of GCA effects of each parental genotype, which are important indicators of the value of inbred lines in hybrid

Table 1: Analysis of variance and combining abilities for disease severity scores in sunflower genotypes inoculated by two *Phoma macdonaldii* isolates (MP8 and MP10)

Source of variation	Individual			Combined	
	df	MS _{MP8 isolate}	MS _{MP10 isolate}	df	MS
Variance analysis					
Isolate	—	—	—	1	3.140*
Genotype	14	18.67***	20.24***	14	20.22***
Genotype \times isolate	—	—	—	14	18.70***
Replication	2	0.46**	0.02 ^{ns}	4	0.240
within isolates					
Residual	28	0.08	0.13	56	0.112
Diallel analysis					
GCA	4	54.04***	59.75***		
SCA	10	4.52***	4.44***		
Error	28	0.03	0.04		

*, ** and ***Significant at $P = 0.05$, $P = 0.01$ and $P = 0.001$, respectively.

df, degrees of freedom; GCA, general combining ability; MS, mean of squares; ns, non-significance; SCA, specific combining ability.

Table 2: Estimated general combining ability (GCA) effects and mean disease severity scores of five sunflower genotypes and their F_1 hybrids inoculated by two *Phoma macdonaldii* isolates. The parental values are presented as bold type

Parents	1	2	3	4	5	GCA
MP8 isolate						
1. ENSAT-B5	7.91^a	2.47 ^{ef}	7.17 ^b	6.21 ^c	8.07 ^a	1.77***
2. ENSAT-R5	2.37 ^{ef}	2.37^{ef}	2.37 ^{ef}	1.61 ^d	1.87 ^{fg}	-2.05***
3. B454/03			7.30 ^b	3.73 ^d	6.28 ^c	0.97***
4. SDR18				2.00^g	2.74 ^c	-1.30***
5. M6-54-1					6.32^c	0.60***
LSV _(0.05)						0.07
MP10 isolate						
1. ENSAT-B5	7.48^a	7.22 ^a	7.06 ^a	2.23 ^{cd}	2.01 ^{de}	1.19***
2. ENSAT-R5		7.05^a	7.25 ^a	3.13 ^b	3.28 ^b	1.41***
3. B454/03			7.07 ^a	2.75 ^{bc}	1.46 ^{de}	1.08***
4. SDR18				1.66^{de}	1.96 ^{de}	-1.68***
5. M6-54-1					1.20^f	-2.00***
LSV _(0.05)						0.08

***Significant at $P = 0.001$.

^aParental or F_1 hybrid mean disease severity scores; representing the mean of host reactions, scale ranging from 1 (resistance) to 9 (susceptibility), in three replications, each containing 20 cotyledon petioles; means followed by the same letter are not significantly different ($P = 0.05$) according to Student Newman-Keuls test.

LSV, least significant value.

combinations, are presented in Table 2. Two genotypes had significantly positive and one had significantly negative GCA estimates for both isolates tested, whereas the other two had significant values but their signs were in contrast according to the isolates. ENSAT-R5 had a negative value for the MP8 isolate, whereas its value was positive for the MP10 isolate. In contrast, the M6-54-1 genotype showed a positive GCA for MP8 and a negative value for MP10.

Genotypes used in this study differed considerably for seedling partial black stem resistance (Tables 1 and 2). These results confirm the genetic variability for partial resistance to *Phoma* black stem that has been previously reported in both field (Pères et al. 1994) and controlled conditions (Roustaei et al. 2000a, Rachid Al-Chaarani et al. 2002, Bert et al. 2004). Roustaei et al. (2000a) have reported that the disease severity score at the seedling stage is the same as that at the adult plant stage. Up to now, reports about black stem resistance in

sunflower indicate a lack of full resistance in sunflower genotypes (Debaeke and Pérès 2003). The seedling petiole test used in this study allows control of the inoculum load per plant, thus minimizing the number of plants escaping infection and the consequent potential for reducing the false negatives. Combined analysis of variance showed significant interactions between sunflower genotypes and *Phoma* isolates (Table 1) suggesting that partial resistance to *Phoma* black stem should be isolate-specific in sunflower. Contrasting reactions of two parental lines (M6-54-1 and ENSAT-R5) according to isolates supported this finding (Table 2). Also Larfeil et al. (2002) found large differences between French *Phoma* isolates and those of other countries in the response of sunflower genotypes for resistance to *Phoma* black stem infection. Environmental factors such as light and temperature could alter the expression of resistance, however, such factors could not influence the results presented here because the experiments were conducted under controlled environmental conditions. Genotype \times isolate interactions must be due to different genes or genomic regions involved in resistance to a given isolate. In other host-pathogen systems such as sunflower-*Phomopsis* (Viguié et al. 1999), rice-leaf blast (Roumen 1992, Zenbayashi et al. 2005) and wheat-septoria tritici blotch (Chartrain et al. 2004) similar effects have been observed.

Significant GCA and SCA effects indicated the importance of both additive and non-additive genetic components in controlling *Phoma* black stem partial resistance in the sunflower genotypes studied. This is in agreement with the earlier report from factorial crosses indicating that additive and dominant effects of genes control black stem partial resistance (Roustae et al. 2000a). A significant negative value for GCA indicates a contribution toward resistance, while a positive value presents the opposite. Therefore, a high level of partial resistance to *Phoma* black stem for both isolates may be obtained by crossing parents with low disease severity scores and high negative GCA effects. On the basis of these new results through seedling tests, the cross between M6-54-1 and ENSAT-R5 genotypes, which are the best general combiners for MP8 and MP10, respectively, could be of value for improving black stem partial resistance to these *P. macdonaldii* isolates.

References

- Bert, P.-F., G. Dechamp-Guillaume, F. Serre, I. Jouan, D. Tourvieille de Labrouhe, P. Nicolas, and F. Vear, 2004: Comparative genetic analysis of quantitative traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.) 3. Characterization of QTL involved in resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Phoma macdonaldii*. *Theor. Appl. Genet.* 109, 865–874.
- Carson, M. L., 1991: Relationship between *Phoma* black stem severity and yield losses in hybrid sunflower. *Plant Dis.* 75, 1150–1153.
- Chartrain, L., P. A. Brading, J. C. Makepeace, and J. K. M. Brown, 2004: Sources of resistance to septoria tritici blotch and implications for wheat breeding. *Plant Pathol.* 53, 454–460.
- Debaeke, P., and A. Pérès, 2003: Influence of sunflower (*Helianthus annuus* L.) crop management on *Phoma* black stem (*Phoma macdonaldii* Boerema). *Crop Prot.* 22, 741–752.
- Donald, P. A., J. R. Venette, and T. J. Gulya, 1987: Relationship between *Phoma macdonaldii* and premature death of sunflower. *Plant Dis.* 71, 466–468.
- Griffing, B., 1956: Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing systems. *Aust. J. Biol. Sci.* 9, 463–493.
- Larfeil, C., G. Dechamps-Guillaume, and G. Barrault, 2002: *Phoma macdonaldii* Boerema/*Helianthus annuus* L. interaction. *Helia* 36, 153–160.
- Pérès, A., A. M. Allard, J. Deverchère, and A. Penaud, 1994: *Phoma* du tournesol: étude de la protection fongicide au champ. In: The National Plant Protection Association (NPPA) (ed.), *Proc 4th Int Conf on Plant Disease*, 1179–1185. Bordeaux, France.
- Rachid Al-Chaarani, G., A. Roustae, L. Gentzbittel, L. Mokrani, G. Barrault, G. Dechamp-Guillaume, and A. Sarrafi, 2002: A QTL analysis of sunflower partial resistance to downy mildew (*Plasmopara halstedii*) and black stem (*Phoma macdonaldii*) by the use of recombinant inbred lines (RILs). *Theor. Appl. Genet.* 104, 490–496.
- Roumen, E. C., 1992: Small differential interactions for partial resistance in rice cultivars to virulent isolates of the blast pathogen. *Euphytica* 64, 143–148.
- Roustae, A., G. Barrault, G. Dechamps-Guillaume, P. Lesigne, and A. Sarrafi, 2000a: Inheritance of partial resistance to black stem (*Phoma macdonaldii*) in sunflower. *Plant Pathol.* 49, 396–401.
- Roustae, A., D. Costes, G. Dechamp-Guillaume, and G. Barrault, 2000b: Phenotypic variability of *Leptosphaeria lindquistii* (*Phoma macdonaldii*) a fungal pathogen of sunflower. *Plant Pathol.* 49, 227–234.
- Sackston, W. E., 1992: On a treadmill: breeding sunflower for resistance to disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 30, 529–551.
- Sarrafi, A., H. Kayyal, G. Rachid Al-Chaarani, F. Cantin, A. S. Chaline, and A. S. Duridelle, 2000: Inheritance of organogenesis parameters in cotyledons of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *J. Genet. Breed.* 54, 227–231.
- Viguié, A., F. Vear, and D. Tourvieille de Labrouhe, 1999: Interactions between French isolates of *Phomopsis*/*Diaporthe Helianthi* Munt.-Cvet. et al. and sunflower (*Helianthus annuus* L.) genotypes. *Eur. J. Plant Pathol.* 105, 693–702.
- Zenbayashi, K., T. Ashizawa, T. Tani, and S. Koizumi, 2005: *Pi34-AVRPi34*: a new gene for gene interaction for partial resistance in rice to blast caused by *Magnaporthe grisea*. *J. Gen. Plant. Pathol.* 71, 59–401.
- Zhang, Y., M. S. Kang, and K. R. Lamkey, 2005: DIALLEL-SAS05: a comprehensive program for Griffing's and Gardner-Eberhart analyses. *Agron. J.* 97, 1097–1106.

Resultats et Discussion

Une technique d'inoculation, pour être satisfaisante, doit être très proche de l'infection survenant dans des conditions naturelles, au cours de laquelle toutes les plantes sont contaminées de façon identique. Les conditions présentes dans le phytotron et la méthode d'inoculation choisie dans nos expérimentations nous ont permis d'atteindre cet objectif. D'après les résultats de Roustae et al. (2000a) et de Larfeil (2003), il n'existe pas d'interaction entre le stade phénologique et le comportement des génotypes de tournesol. De plus, le comportement variétal en champ est identique à celui observé en serre à tous les stades phénologiques (Larfeil 2003). Nos résultats d'études d'interaction 'génotype-isolat' ont montré qu'il existe des différences significatives entre les isolats, entre les lignées ainsi qu'une forte interaction isolat/génotype. Les lignées, indépendamment des isolats, présentent des sensibilités différentes face au Phoma. Les lignées B454/03, ENSAT-B5 et LC1064C ont été sensibles à tous les isolats alors que les deux lignées Américaines SDR19 et SDR18 ont montré une résistance à tous les isolats. Ces résultats confirment l'existence, entre les génotypes, d'une importante variabilité génétique au niveau de la résistance partielle vis-à-vis de cette maladie, précédemment montrée après expérimentations en champs (Pérès et al., 1994) et en conditions contrôlées (Roustae et al., 2000a; Rachid Al-Chaarani et al., 2002; Abou Al Fadil et al., 2004; Bert et al., 2004). De même, les isolats, indépendamment des lignées, possèdent des agressivités différentes. L'isolat MP3 a été agressif, le MA6 l'a été peu, les autres étant moyennement agressifs. Ces résultats confirment la variabilité déjà observée précédemment (Roustae et al., 2000b; Larfeil 2003). L'interaction qui existe entre les isolats et les lignées, dans notre étude, signifie que la sensibilité d'une variété donnée peut être différente suivant l'isolat utilisé, ce qui pourrait impliquer la présence de pathotypes. Grâce à la méthode "median polish" deux lignées AS613 et PAC2 présentant une résistance spécifique à l'isolat MP8 ont été identifiées. Cette étude montre que la variabilité du Phoma

se concrétise en présence de l'hôte. En fonction de l'isolat, la sensibilité des géotypes peut changer. Ceci laisse supposer l'existence de pathotypes potentiels. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Larfeil (2003), ils témoignent de l'existence d'une importante variabilité au niveau de la résistance partielle selon les isolats du Phoma et les lignées de tournesol. Ce type d'interaction existe également avec d'autres champignons tels que *Phomopsis helianthi*. Elle révèle l'importance de disposer de souches représentatives de la diversité du champignon pour la réalisation de programmes de sélection fiables. Viguié et al. (1999) dans le pathosystème *Phomopsis*/tournesol a mis en évidence un effet isolat ainsi qu'un effet géotype, avec quelques changements dans l'ordre des hybrides. Cependant, ces changements ne sont pas majeurs et ne provoquent pas d'inversion de classement dans l'échelle de résistance comme cela est le cas pour le Phoma. Ballinger et Salisbury (1996) ont quant à eux mis en évidence une interaction *Leptosphaeria maculans*/Brassica sp, avec la découverte de 14 races pour le stade semis et 7 races pour le stade plantes adultes.

Les résultats de l'étude diallèle montre que l'aptitude générale à la combinaison (AGC) des différentes lignées étudiées ainsi que l'aptitude spécifique à la combinaison (ASC) des différents hybrides F1 sont significatives. Les effets significatifs d'AGC et ASC montrent l'importance des composants génétiques additifs et non additifs qui contrôlent la résistance partielle aux isolats du Phoma. Cependant, pour les isolats étudiés, les ratios SC(AGC)/SC(ASC) montrent la prépondérance des effets additifs dans le contrôle génétique de la résistance partielle. Ceci est en accord avec des travaux précédant où l'AGC était plus importante que l'ASC (Roustae et al., 2000a). Selon les géotypes, la valeur de l'AGC qui est l'indicateur important de la valeur de lignées dans la combinaison hybride est variable, positive ou négative et significative. Une valeur négative pour l'AGC indique la contribution vers la résistance, tandis qu'une valeur positive présente l'opposé. Donc, un haut niveau de résistance partielle aux deux isolats étudiés, peut être obtenu en croisant des parents

présentant une valeur hautement négative pour l'AGC. Le génotype M6-54-1 a montré sa capacité à transmettre la résistance à l'isolat MP10 et la sensibilité à l'isolat MP8 dans sa descendance après hybridation. D'autre part, ENSAT-R5 a montré sa capacité à transmettre la résistance à l'isolat MP8 et la sensibilité à l'isolat MP10. Le croisement entre M6-54-1 et ENSAT-R5, pourrait donc permettre d'améliorer la résistance à ces isolats du Phoma.

CHAPITRE IV: IDENTIFICATION DES QTLS CONTRÔLANT LA RESISTANCE PARTIELLE AU PHOMA

Introduction

Durant les deux dernières décennies, les marqueurs moléculaires ont été utilisés avec succès afin de développer des cartes génétiques chez de nombreuses espèces végétales. Ces cartes génétiques permettent de détecter des loci contrôlant des caractères quantitatifs. Plusieurs cartes génétiques ont été construites chez le tournesol grâce à l'utilisation de marqueurs de types RFLP (Gentzbittel et al., 1995), AFLP (Flores Berrios et al., 2000) et microsatellites (Tang et al., 2002). Ces cartes ont permis la localisation de QTLs impliqués dans un large éventail de processus tels que l'organogenèse (Flores Berrios et al., 2000), la photosynthèse et le statut hydrique (Hervé et al., 2001), la teneur en huile des graines (Mokrani et al., 2002) et les caractères agronomiques (Rachid Al-Chaarani et al., 2004). Des QTL associés à la résistance aux maladies ont également été identifiés tels ceux conférant la résistance à *Sclerotinia sclerotiorum* (Mestries et al., 1998; Micic et al., 2005a,b) et *Plasmopara halstedii* (Rachid Al-Chaarani et al., 2002). Concernant le Phoma, Rachid Al-Chaarani et al. (2002) en utilisant des lignées recombinantes issues d'un croisement entre les génotypes PAC2 et RHA266 ont identifié 7 QTLs contrôlant la résistance partielle à ce pathogène. Bert et al. (2004), en utilisant des familles F2-F3 issues d'un croisement entre les génotypes PAZ2 et FU ont mis en évidence 4 QTLs contrôlant la résistance partielle à cette maladie. Les études génétiques mentionnées ci-dessus ont été réalisées suite à une inoculation des plantules de tournesol à l'aisselle des pétioles de cotylédons avec un isolat agressif de *P. macdonaldii* (MP6). D'autre part, une grande variabilité a été notée entre des isolats du Phoma, au niveau de leur agressivité (Roustaei et al., 2000b; Larfeil, 2003). Cependant, dans les investigations citées ci-dessus, la spécificité « isolat » de la résistance partielle n'a pas été étudiée. L'utilisation de l'approche QTL pour étudier cette spécificité de la résistance quantitative a été décrite dans plusieurs articles (Leonards-Schippers et al., 1994; Cho et al., 2004; Rocherieux et al., 2004; Talukder et al., 2004). L'objectif de la présente étude était l'identification des

QTLs spécifiques et non-spécifiques contrôlant la résistance partielle face à des isolats du Phoma. Nous avons développé une nouvelle carte de liaison du tournesol en utilisant 100 individus F2 issues du croisement entre M6-54-1 et ENSAT-B4, identifiés par nos expérimentations précédentes. Les régions génomiques contrôlant la résistance partielle aux isolats de *P. macdonaldi* ont été identifiés. Les résultats de cette expérimentation sont présentés dans l'article N° 3 (Darvishzadeh et al., 2007b), soumis pour publication dans 'Plant Pathology'. Dans une autre expérimentation et en utilisant la carte enrichie du laboratoire (Poormohammad Kiani et al. 2007), des QTLs contrôlant la résistance quantitative au Phoma ont été identifiées en utilisant 99 LR issue du croisement entre PAC2 et RHA266 inoculé par deux isolats (MP8 et MP10). Les résultats de cette expérimentation sont présentés dans l'article N° 4 (Darvishzadeh et al., 2007c), sous presse dans 'Plant Pathology'.

Comme précisé précédemment, la résistance au Phoma d'une population de 120 mutants et de sa lignée originelle (AS613) ont été évaluées avec un isolat français du *P. macdonaldii* (MP6). Les résultats ont révélé une variabilité génétique au niveau de la résistance partielle dans cette population de mutant. Nous nous sommes intéressés à l'étude des associations marqueurs moléculaires potentiellement liés à la résistance partielle au Phoma. Pour mener à bien cette étude, des profils moléculaires de 60 mutants sélectionnés parmi les 120 a été réalisée par la technique AFLP en utilisant 17 combinaisons d'amorces EcoRI/MseI. L'association entre les marqueurs AFLP et les mesures de sévérité de la maladie a été estimée par analyse de régression multiple par étapes, où des lectures de sévérité de la maladie ont été traitées comme variables dépendantes tandis que les marqueurs d'AFLP étaient employés en tant que variables indépendantes. Les résultats de cette expérimentation sont présentés dans l'article N° 5 (Darvishzadeh et al., 2007d), soumis pour publication dans 'Canadian Journal of Plant Pathology'.

Quantitative trait loci associated with partial resistance to *Phoma macdonaldii* isolates in sunflower

R. Darvishzadeh, S. Poormohammad Kiani, T. Huguet, G. Dechamp-Guillaume, L. Gentzbittel, A. Sarrafi

*Laboratoire de Biotechnologie et Amélioration des Plantes (BAP), IFR 40, INP-ENSAT, 18
Chemin de Borde Rouge, BP 32607, 31326 Castanet Tolosan, France*

Darvishzadeh et al. (2007b). Plant Pathology (Soumis)

Corresponding author: Professor A. Sarrafi

Laboratoire de Biotechnologie et Amélioration des Plantes (BAP), IFR 40, INP-ENSAT, 18
Chemin de Borde Rouge, BP 32607, 31326 Castanet Tolosan, France

E-mail: sarrafi@ensat.fr

Phone: + 33 5 62193580

Fax: + 33 5 62193581

The main objective of the present study was to identify quantitative trait loci (QTLs) involved in partial resistance of a mutant line (M6-54-1) to black stem disease, which is caused by *Phoma macdonalii*. M6-54-1 is one of the mutant lines developed in our department by seeds irradiation of AS613 genotype with gamma rays. M6-54-1 was crossed as female parent with the susceptible inbred line ENSAT-B4. Parents and 103 F3 families were evaluated with three *P. macdonalii* isolates in controlled conditions. The experimental design was a randomized complete block with three replications. Whatever the isolate, M6-54-1 showed a high level of resistance while ENSAT-B4 was susceptible. High genetic variability and transgressive segregation were observed among F3 families for partial resistance to *P. macdonaldii* isolates. A genetic linkage map was constructed using 88 amplified fragment length polymorphism (AFLP) and 44 simple sequence repeat (SSR) markers. Mapping population consisted in 100 F2 genotypes. The map comprises 17 linkage groups (LGs) with an overall size of 1490 centimorgan (cM) and mean density of one marker per 12.44 cM. Composite interval mapping analysis revealed 17 putative QTLs, localized on seven linkage groups, with phenotypic variance ranging from 4 to 42% indicating that both broad-spectrum and isolate-specific QTLs are involved in the control of black stem resistance in sunflower. A total of eight 'isolate-specific' QTLs were detected for partial resistance, others were common to different isolates. The marker 'E38M61_5' on LG8 which is linked to major QTLs involved in partial resistance to three isolates, could be good candidate to develop marker-assisted selection (MAS) aimed to introduce resistance to three *P. macdonaldii* isolates into elite sunflower breeding lines.

Keywords: black stem, *Helianthus annuus* L., induced mutant, partial resistance, QTL mapping

Introduction

Phoma black stem, caused by the necrotrophic fungus *Phoma macdonaldii* Boerema, is one of the most important diseases of sunflower in the world. The disease has been spreading steadily in French since 1990, and the fungus is now a major component of the pathogenic complex on sunflower (Pérès & Lefol, 1996). Generally, *P. macdonaldii* infects the lower leaves of sunflower, through spores spread by wind or rain or by leaf-feeding insects. The most notable symptom of infection is the formation of black spots on the stem, around the petiole insertion point. At the base of stems coalescing spots develop into a wide black sleeve, which causes premature ripening resulting in yield losses of 10 to 30% (Penaud, 1996), reduction in thousand seed weight and oil content (Carson, 1991). Stunted plants with thin stems, smaller heads, lighter and fewer seeds per head, blackened pith and frequently premature death have been also observed (Donald *et al.*, 1987).

The inheritance of partial resistance of sunflower to *P. macdonaldii* was reported to be quantitative, under additive and dominant gene effects (Roustaei *et al.*, 2000a, Darvishzadeh & Sarrafi, 2007). Recombinant inbred lines (RILs) derived from a cross between PAC2 and RHA266 genotypes were inoculated by an aggressive French isolate of Phoma black stem (MP6) and seven QTLs were identified (Rachid Al-Chaarani *et al.*, 2002). Bert *et al.* (2004) using F₂-F₃ families derived from a cross between PAZ2 and FU genotypes detected four QTLs using the same isolate.

Extensive variation has been detected in aggressiveness among French *P. macdonaldii* isolates towards different sunflower genotypes in seedling tests (Roustaei *et al.*, 2000b, Darvishzadeh *et al.*, 2007a). The high genetic variability for pathogenicity in *P. macdonaldii* requires simultaneous incorporation of several genes for resistance to remain effective in cultivars used over a large area. Recently, we have identified a resistant mutant line to MP6 isolate of *P. macdonaldii*. This mutant showed partial resistance to some of *P. macdonaldii*

isolates in genotype-isolate interaction experiments (Darvishzadeh *et al.*, 2007a). The current study aimed the identification of QTLs controlling partial resistance to *P. macdonaldii* isolates effective in this mutant line.

Materials and Methods

Sunflower genotypes and *P. macdonaldii* isolates

Based on screening of 28 sunflower inbred lines against seven *P. macdonaldii* isolates in controlled conditions, mutant line M6-54-1 was identified showing an altered Phoma black stem resistance, depending on the isolates (Darvishzadeh *et al.*, 2007a). This mutant is one of the mutant lines developed in our department by irradiation of AS613 genotype seeds with gamma rays (Sarraf *et al.*, 2000). M6-54-1 was crossed as female parent with the susceptible inbred line ENSAT-B4. A single F1 hybrid, derived from the cross M6-54-1 × ENSAT-B4 was self-pollinated to produce the F2 progenies used to build the genetic map. F2 plants were self-pollinated to generate F3 families, used to assess disease resistance.

Three different *P. macdonaldii* isolates (MA6, MP6 and MP10) were used in our experiments under controlled conditions. These isolates were derived from naturally infected plants in different regions of France and their characteristics have been previously described by Roustaei *et al.* (2000b). Conservation of isolates was done using the method described by Roustaei *et al.* (2000b).

Pathological tests and disease assessments

The responses of 103 F3 families and parental lines to the three above mentioned isolates were evaluated in three experiments in which the plant materials were inoculated by one of the three isolates. The experimental design was a randomized complete block with three replications. Each replication consisted of 12 seedlings. Pathological tests were performed using the method described by Darvishzadeh *et al.* (2007a). Cotyledon petioles of seedlings were scored seven days after inoculation according to the percentage of the petiole area

exhibiting disease symptoms. A score of 1 (resistant) to 9 (susceptible) was given in relation to the proportion of petiole area showing necrosis as proposed by Roustaei *et al.* (2000a), where: 1=0-5%, 2=6-10%, 3=11-20%, 4=21-30%, 5=31-40%, 6=41-60%, 7=61-80%; 8=81-99% and 9=100%, with necrosis spreading down the stem.

DNA extraction and molecular data

The genomic DNA of parental lines and each F2 individual were extracted from two-week old plants according to the method of extraction and purification presented by Dellaporta *et al.* (1985). The parents of the mapping population were screened with 339 'ORS' SSR markers from the SSR database (Tang *et al.*, 2002) and 180 'HA' SSR markers developed by INTA (Paniego *et al.*, 2001) as well as several AFLP primer combinations for polymorphism. All SSR markers are public and can be provided upon request. Polymerase chain reaction conditions for the SSR analysis were the same presented by Paniego *et al.* (2001) and Tang *et al.* (2002). The AFLP procedure was conducted as described by Rachid Al-Chaarani *et al.* (2004).

Genetic map construction

Linkage map was constructed with 44 SSR and 86 AFLP markers which showed polymorphism between parental lines. Mapping population consisted in 100 F2 genotypes. For construction of the genetic map, the program CarthaGene 1.0 was used (De Givry *et al.*, 2005). Chi-square-tests were performed for segregation distortion of each locus. Loci were assembled into groups using likelihood odds (LOD) ratios with a LOD threshold of 3.0 and a maximum recombination frequency threshold of 0.35. The likelihoods of different locus orders were compared and the locus-order estimate with the highest likelihood was selected for each linkage group. The Kosambi (1944) mapping function was used to calculate map distances (cM) from recombination frequencies. Mapchart 2.1 was used for graphical

presentation of linkage groups and map position of the SSR and AFLP markers (Voorrips, 2002).

Data analysis and QTL mapping

ANOVA of the disease severity data was performed using the general linear model (GLM) procedure in the SAS software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). The function 'FREQ' of SSPS software (SPSS/PC-10, SPSS Inc., Chicago, IL, USA; <http://www.spss.com>) was used to analyse the frequency distribution of F3 families and their parents for partial resistance to each *P. macdonaldii* isolate. Genetic and environmental variances as well as broad-sense heritability were calculated according to Falconer and Mackay (1997) using least-square estimates of genetic parameters.

QTLs were detected using the composite interval mapping (CIM) by QTL Cartographer, version 1.16 with model 6 of Zmapqtl (Basten *et al.*, 2002) and a LOD score threshold of 3.0. QTLs identified for the three isolates were compared on the basis of overlapping support intervals; a decrease in the LOD score of 1.0 determined the end point of support interval for each QTL. Additive and dominant effects of the detected QTLs as well as the percentage of phenotypic variation explained by each QTL (R^2) were estimated using the Zmapqtl programme of QTL Cartographer (Basten *et al.*, 2002).

Results

Phenotypic data

In spite of the existence of variations in disease severity score over replicates in the progeny, analysis of variance indicated that highly significant differences were present between the two parents and among the F3 families for partial resistance to all of the three *P. macdonaldii* isolates (Table 1). Whatever the isolate, the parental line M6-54-1 showed a high level of resistance (disease severity score from 2.05 to 3.10), while ENSAT-B4 was susceptible (disease severity score from 6.05 to 6.35), showing that the two parents differed in genes

controlling these traits (Table 2). The disease severity score of the F1 plants was variable depending on the isolate used for inoculation. For MA6 and MP10 isolates, the mean disease severity score of F1 plants was similar to the mid-parent values, suggesting the likelihood of additivity for the partial resistance (Table 2). For the isolate MP6, the mean disease severity of the F1 plants was significantly higher than the mid-parent value and close to that of the susceptible parent, indicating that the resistance carried by M6-54-1 to this isolate was recessive (Table 2). Recessive polygenic resistance has been reported in several research work (Chaerani & Voorrips, 2006). Broad-sense heritability ranged from 0.46 to 0.71 depending on the isolate (Table 2). Frequency distribution of F3 families and their parents for partial resistance to the three isolates showed continuous patterns, suggesting that partial resistance is controlled by a polygenic system (Fig. 1). The disease severity scores of F3 families for MA6 and MP6 isolates ranged from 2.72 to 8.17 and from 1.36 to 7.50, respectively. Their distributions were slightly skewed towards higher values (susceptibility). The distribution of disease severity score for MP10 isolate approximately followed a normal distributions, ranging from 2.65 to 7.83 (Fig. 1). Transgressive segregations were observed for all of the three isolates. Some of the F3 families showed less disease severity values than their resistant parent, whereas some other families showed higher disease severity values than their susceptible parent (Fig. 1).

Linkage map and QTL analysis

The genetic map was constructed with 88 AFLP and 44 SSR markers (Fig. 2). Markers exhibiting significant distortion ($P < 0.05$) from the expected Mendelian ratios of 3:1 (for AFLP markers) or 1:2:1 (for SSR markers) were excluded from mapping process. The map comprises 17 linkage groups (LGs) with an overall size of 1490 cM and mean density of one marker per 12.44 cM. Of the 17 groups, 12 could be associated to already defined LGs (Tang *et al.* 2002; Poormohammad Kiani *et al.* 2007), through the localization of SSR markers. For

these 12 groups, we used the same numbers used by Tang *et al.* 2002 and Poormohammad Kiani *et al.* 2007; the others 5 groups were named by letters A to E (Fig. 2).

Composite interval mapping analysis revealed 17 putative QTLs, localized on seven linkage groups, involved in black stem resistance against the three isolates (Table 3, Fig. 2). QTLs were designated as '*bsr*' corresponding to black stem resistance followed by the isolate name, linkage group and QTL number, respectively. Five QTLs were detected for each of the two MA6 and MP6 isolates (Table 3). QTLs involved in partial resistance to the MP6 isolate were located on linkage groups 1, 4, 5 and 8; and those for partial resistance to MA6 on linkage groups 5, 8, 9 and 10. The phenotypic variance explained by each QTL (R^2) ranged from 4% to 42% (Table 3). As far as MP10 isolate is concerned seven QTLs were identified which are situated on linkage groups A, 1, 5, 8 and 9 with phenotypic variance explained by each QTL (R^2) ranging from 4 to 18% (Table 3). Three out of the seventeen detected QTLs for three isolates are co-localized on linkage group 8 (Fig 2). This locus, near the AFLP marker 'E38M61_5' explained the largest proportion of the phenotypic variance for all of the three isolates (18- 42%) (Table 3). For this QTL, the dominant effects is more important than the additive ones. The rest were identified for one or two isolates. The sign of the gene effects showed that favourable alleles for QTLs controlling partial resistance to different isolates come from both parental lines.

Discussion

Phoma black stem resistance is a quantitative trait, confounded by environmental effects like temperature, humidity, and abundance of inoculum. Therefore, artificial inoculation is indispensable for a reliable Phoma black stem resistance evaluation of sunflower genotypes. Artificial inoculation method developed by Roustaei *et al.* (2000a) has been used in different experiment including the present one. All plants with no visible lesion on the petiole were defined as not infected, and excluded from the experiments as up to now reports about black

stem resistance in sunflower indicate the lack of full resistance in cultivated sunflower (Roustaei *et al.*, 2000a; Debaeke & Pérès, 2003). F3 families studied in the present experiment showed high genetic variation for partial resistance to *P. macdonaldii* isolates. These results confirm the existence of genetic variability for partial resistance to Phoma black stem that has been previously reported in both field (Pérès *et al.*, 1994) and controlled conditions (Roustaei *et al.*, 2000a; Rachid Al-Chaarani *et al.*, 2002; Abou Al Fadil *et al.*, 2004; Bert *et al.*, 2004; Darvishzadeh *et al.*, 2007a). For all three isolates tested, transgressive segregation toward higher resistance and susceptibility was observed in F3 families compared with the two parents, suggesting that the susceptible parent ENSAT-B4 contributed also favorable alleles for partial resistance. For example, four out of seven favorable QTL alleles for partial resistance to MP10 isolate originate from the susceptible parent (Table 3). Transgressive segregation has previously been reported by Rachid Al-Chaarani *et al.* (2002) and Bert *et al.* (2004) for partial resistance to black stem in sunflower. Broad-sense heritabilities for partial resistance to MA6, MP6 and MP10 isolates was 0.65, 0.71 and 0.46, respectively, which is similar to those presented by Rachid Al-Chaarani *et al.* (2002) and Roustaei *et al.* (2000a).

The results of the present study indicated that both broad-spectrum and isolate-specific QTLs are involved in the control of Phoma black stem resistance in sunflower. Seventeen genomic regions containing putative QTLs associated with resistance to three Phoma black stem isolates were identified. Of the seventeen genomic regions detected, three QTLs (*bsrMA6.8.1*, *bsrMP6.8.1* and *bsrMP10.8.2*) contributing in partial resistance to three isolates, were co-localized on linkage group 8. These overlapping QTLs are very important as they explain 18, 34 and 42% of phenotypic variance for partial resistance to MP10, MA6 and MP6 isolates, respectively (Table 3). For these QTLs, the dominant effects is more important than the additive ones and alleles having positive effects come from the susceptible parent ENSAT-B4

(Table 3). Besides these QTLs, other overlapping QTLs located two by two on linkage groups 5 and 9 are involved in partial resistance to MA6 and MP10 isolates. As example for the QTLs located on linkage groups 5 (*bsrMA6.5.1* and *bsrMP10.5.2*), in the case of MA6 isolate the dominant effect is more important than the additive one, and alleles having positive effects come from the resistant parent which explain 17% of phenotypic variance, whereas in the case of MP10 the additive effect is more important than dominant and alleles with positive effects come from the susceptible parent ENSAT-B4 explaining 10% of the phenotypic variance. Additional QTLs which are involved in partial resistance to two isolates MP6 and MP10 are detected on linkage group 1 (*bsrMP6.1.1* and *bsrMP10.1.1*). These overlapped QTLs (isolate-non-specific) indicate the involvement of the same genomic regions in partial resistance to different isolates. The 'isolate-non-specific' QTL could be important in general defence mechanism against different isolates. This type of resistance can be explained either by the action of only one gene with pleiotropic effect or by linkage between distinct or related genes (gene family) (Caranta *et al.*, 1997). If resistance results from linkage between genes, these genes could be functionally related (Caranta *et al.*, 1997).

A total of eight 'isolate-specific' QTL were also detected for partial resistance to the three isolates. Two 'isolate-specific' QTLs (*bsrMA6.10.1* and *bsrMA6.10.2*) were detected for partial resistance to MA6 isolate on linkage group 10 but in different positions. '*bsrMA6.10.2*' presented an important phenotypic variance ($R^2 = 21\%$). Three QTLs were detected for partial resistance to MP6 isolate, from which '*bsrMP6.5.1*' is the most important and explain 13% of the phenotypic variance. As far as MP10 isolate is concerned three specific QTL were detected. 'Isolate-specific' QTLs have been described in other plant-pathogen systems, and have been implicated in partial resistance to leaf rust and to leaf stripe in barley (Qi *et al.*, 1999; Arru *et al.*, 2003) and overall resistance in rice blast (Chen *et al.*, 2003), leading to the

hypothesis of specific interaction between regions of the genome and specific determinants of the pathogen isolates.

So far, three studies have been undertaken for mapping QTLs controlling partial resistance to black stem in sunflower (Rachid Al-Chaarani *et al.* 2002; Bert *et al.* 2004; Darvishzadeh *et al.*, 2007b). Rachid Al-Chaarani *et al.* (2002) using an AFLP map, detected seven QTLs for partial resistance to MP6 isolate with moderate phenotypic variance (R^2) ranging from 6% to 17%. Two out of five QTLs identified in the present study for partial resistance to MP6 isolate (*bsrMP6.1.1* and *bsrMP6.8.1*), and two QTLs reported by Rachid Al-Chaarani *et al.* (2002) for the this isolate (*bsr3.1* and *bsr17.1*) were located on the same linkage groups. In another study, Darvishzadeh *et al.* (2007b) using a set of 99 F9 RILs derived from the cross between 'PAC2' and 'RHA266' inoculated by the MP8 and MP10 isolates, identified ten QTLs for partial resistance to the isolates. QTLs involved in partial resistance to MP10 were located on linkage groups 1, 2, 5 and 15. In the present study, two out of seven identified QTLs for partial resistance to MP10 isolate are also located on linkage groupe 5. Bert *et al.* (2004) using an RFLP/AFLP map of F3 families, reported four QTLs for partial resistance of sunflower to MP6 isolate. However, the lack of SSR markers and common linkage group nomenclature in their map makes it difficult to compare the location of QTLs detected in our study and those detected by Bert *et al.* (2004).

In our experiments genomic regions controlling partial resistance to Phoma black stem isolates were identified. Up to now, marker-assisted selection (MAS) for resistance to *P. macdonaldii* is not yet possible because of the lack of efficient molecular markers. QTLs identified in different independent studies are good candidates to develop markers for MAS. To analyze QTLs involved in Phoma reaction, identical markers should be used. LG1, LG5, LG8 and LG10 are good candidates for further analyses to develop molecular markers for

Phoma reaction, as QTLs for resistance to *P. macdonaldii* isolates are already identified on these four linkage groups in different independent studies.

References

- Abou Al Fadil T, Dechamp-Guillaume G, Poormohammad Kiani S, Sarrafi A, 2004. Genetic variability and heritability for resistance to black stem (*Phoma macdonaldii*) in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Journal of Genetic and Breeding* **58**, 323-28.
- Arru L, Francia E, Pecchioni N, 2003. Isolate-specific QTLs of resistance to leaf stripe (*Pyrenophora graminea*) in the ‘Steptoe’ × ‘Morex’ spring barley cross. *Theoretical and Applied Genetics* **106**, 668-75.
- Basten CJ, Weir BS, Zeng Z-B, 2002. QTL Cartographer, version 1.16: program in statistical genetics. North Carolina State University, Raleigh.
- Bert P-F, Dechamp-Guillaume G, Serre F, Jouan I, Tourvieille de Labrouhe D, Nicolas P, Vear F, 2004. Comparative genetic analysis of quantitative traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.) 3. Characterisation of QTL involved in resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Phoma macdonaldii*. *Theoretical and Applied Genetics* **109**, 865-74.
- Caranta C, Lefebvre V, Palloix A, 1997. Polygenic resistance of pepper to potyviruses consists of a combination of isolate-specific and broad-spectrum quantitative trait loci. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **10**, 872-8.
- Carson ML, 1991. Relationship between Phoma black stem severity and yield losses in hybrid sunflower. *Plant Disease* **75**, 1150-3.
- Chaerani R. Voorrips RE, 2006. Tomato early blight (*Alternaria solani*): the pathogen, genetics, and breeding for resistance. *Journal of General Plant Pathology* **72**, 335-47.
- Chen H, Wang S, Xing Y, Xu C, Hayes PM, Zhang Q, 2003. Comparative analyses of genomic locations and race specificities of loci for quantitative resistance to *Pyricularia*

- grisea* in rice and barley. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 2544-9.
- Darvishzadeh R, Sarrafi A, 2007. Genetic analysis of partial resistance to black stem (*Phoma macdonaldii*) in sunflower measured by a seedling test. *Plant Breeding* (in press).
- Darvishzadeh R, Dechamp-Guillaume G, Hewezi T, Sarrafi A, 2007a. Genotype-isolate interaction for resistance to black stem in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Pathology* (in press).
- Darvishzadeh R, Poormohammad Kiani S, Dechamp-Guillaume G, Gentzbittel L, Sarrafi A 2007b. Quantitative trait loci associated with isolate-specific and isolate-non-specific partial resistance to *Phoma macdonaldii* isolates in sunflower. *Plant Pathology* (in press)
- Debaeke P, Pérès A, 2003. Influence of sunflower (*Helianthus annuus* L.) crop management on Phoma black stem (*Phoma macdonaldii* Boerema). *Crop protection* **22**, 741-52.
- De Givry S, Bouchez M, Chabrier P, Milan D, Schiex T, 2005. CARTHAGENE: multi-population integrated genetic and radiation hybrid mapping. *Bioinformatics* **21**, 1703-4.
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB, 1985. Maize DNA minipreps. In: Malberg NY, Messing J, Sussex I, (Eds.), *Molecular Biology of Plants*. Cold Spring Harbor, pp 36-7.
- Donald PA, Venette JR, Gulya TJ, 1987. Relationship between *Phoma macdonaldii* and premature death of sunflower. *Plant Disease* **71**, 466-8.
- Falconer DS, Mackay TFC, 1997. Introduction to Quantitative Genetics. Longman Press, Essex.
- Kosambi DD, 1944. The estimation of a map distance from recombination values. *Annals of Eugenetics* **12**, 172-5.
- Paniego N, Echaide M, Munoz M, Fernandez L, Torales S, Faccio P, Fuxan I, Crrera M, Zandomeni R, Syarez EY, Esteban Hopp H, 2002. Microsatellite isolation and characterization in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Genome* **45**, 34-43.

- Penaud A, 1996. Phoma du tournesol: Recherche des époques de contamination et mise au point de la protection fongicide. In: *Proceedings of the 14th International Sunflower Conference* Beijing, China. Paris, France: International Sunflower association, 694–9.
- Pérès A, Allard AM, Deverchère J, Penaud A, 1994. Phoma du tournesol: étude de la protection fongicide au champ. In: *4ème Conférence Internationale Sur les Maladies Des Plantes*, Bordeaux, France. Paris, France: Association Nationale de Protection des Plantes, 1179-85.
- Pérès A, Lefol C, 1996. *Phoma macdonaldii* Boerema: éléments de biologie et mise au point d'une méthode de contamination artificielle en conditions contrôlées. In: *Proceedings of the 14th International Sunflower Conference* Beijing, China. Paris, France: International Sunflower association, 687–93.
- Poormohammad Kiani S, Talia P, Maury P, Grieu P, Heinz R, Perrault A, Nishinakamasu V, Hopp E, Gentzbittel L, Paniego N, Sarrafi A, 2007. Genetic analysis of plant water status and osmotic adjustment in recombinant inbred lines of sunflower under two water treatments. *Plant Science* **172**, 773-87.
- Qi X, Jiang G, Chen W, Niks RE, Stam P, Lindhout P, 1999. Isolate-specific QTLs for partial resistance to *Puccinia hordei* in barley. *Theoretical and Applied Genetics* **99**, 877-84.
- Rachid Al-Chaarani G, Roustae A, Gentzbittel L, Mokrani L, Barrault G, Dechamp-Guillaume G, Sarrafi A, 2002. A QTL analysis of sunflower partial resistance to downy mildew (*Plasmopara halstedii*) and black stem (*Phoma macdonaldii*) by the use of recombinant inbred lines (RILs). *Theoretical and Applied Genetics* **104**, 490-6.
- Rachid Al-Chaarani G, Gentzbittel L, Huang, XQ, Sarrafi A, 2004. Genotypic variation and identification of QTLs for agronomic traits, using AFLP and SSR markers in RILs of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theoretical Applied Genetics* **109**, 1353-60.

- Roustae A, Barrault G, Dechamps-Guillaume G, Lesigne P, Sarrafi A, 2000a. Inheritance of partial resistance to black stem (*Phoma macdonaldii*) in sunflower. *Plant Pathology* **49**, 396-401.
- Roustae A, Costes D, Dechamp-Guillaume G, Barrault G, 2000b. Phenotypic variability of *Leptosphaeria lindquistii* (*Phoma macdonaldii*) a fungal pathogen of sunflower. *Plant Pathology* **49**, 227-34.
- Sarrafi A, Kayyal H, Rachid Al-Chaarani G, Cantin F, Chaline AS, Durielle AS, 2000. Inheritance of organogenesis parameters in cotyledons of sunflower (*Heliantus annuus* L). *Journal of Genetic and Breeding* **54**, 227-31.
- Tang S, Yu JK, Slabaugh MB, Shintani DK, Knapp SJ, 2002. Simple sequence repeat map of the sunflower genome. *Theoretical and Applied Genetics* **105**, 1124-36.
- Voorrips RE, 2002. MapChart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *The Journal of Heredity* **93**, 77-8.

Table 1 Mean squares for disease severity score in sunflower F3 families and their two parental lines infected by three *Phoma macdonaldii* isolates in controlled conditions.

Source of Variation	<i>d.f.</i> ^a	MA6	MP6	MP10
Genotype	102	3.55***	6.21***	2.97***
Block	2	9.76***	17.65***	14.73***
Residual	204	0.54	0.76	0.83
Total	308	1.59	2.67	1.63

Coefficients of Variation (C.V.) are 11.50, 16.99 and 17.83 percent for MA6, MP6 and MP10 isolates, respectively.

^a *d.f.* = degrees of freedom.

*** : Significant at 0.001 probability level.

Table 2 Mean of parental lines (M6-54-1 and ENSAT-B4), F1 and 103 F3 families as well as the estimate of heritabilities for partial resistance to *Phoma macdonaldii* isolates (MA6, MP6 and MP10) in sunflower

Items	MA6	MP6	MP10
M6-54-1 (P1)	3.10 ^a	2.05	2.57
ENSAT-B4 (P2)	6.25	6.35	6.05
P1-P2	-3.15*	-4.30*	-3.48*
$\bar{X}_P = (P1+P2)/2$	4.68	4.20	4.31
\bar{X}_{F1}	5.43	5.85	4.33
$\bar{X}_{F1} - \bar{X}_P$	0.75 ^{ns}	1.65*	0.02 ^{ns}
\bar{X}_{F3}	6.39	5.19	5.22
$\bar{X}_{F3} - \bar{X}_P$	1.71*	0.99 ^{ns}	0.91 ^{ns}
F3 families Rang	2.72-8.17	1.36-7.50	2.65-7.83
LSD 0.05	1.18	1.40	1.47
h ²	0.65	0.71	0.46

^a Average disease severity score of genotypes challenged by each *P. macdonaldii* isolates, seven days post inoculation, in three replications, each containing 24 cotyledon petioles.

\bar{X}_P : Mean of parents.

\bar{X}_{F1} : Mean of F1 plants.

\bar{X}_{F3} : Mean of 103 F3 families

LSD_{0.05}: Least significant differences calculated using t_{0.05} and error mean square of each experiment.

* : Significant at 0.05 probability level.

h²: Broad-sense heritability.

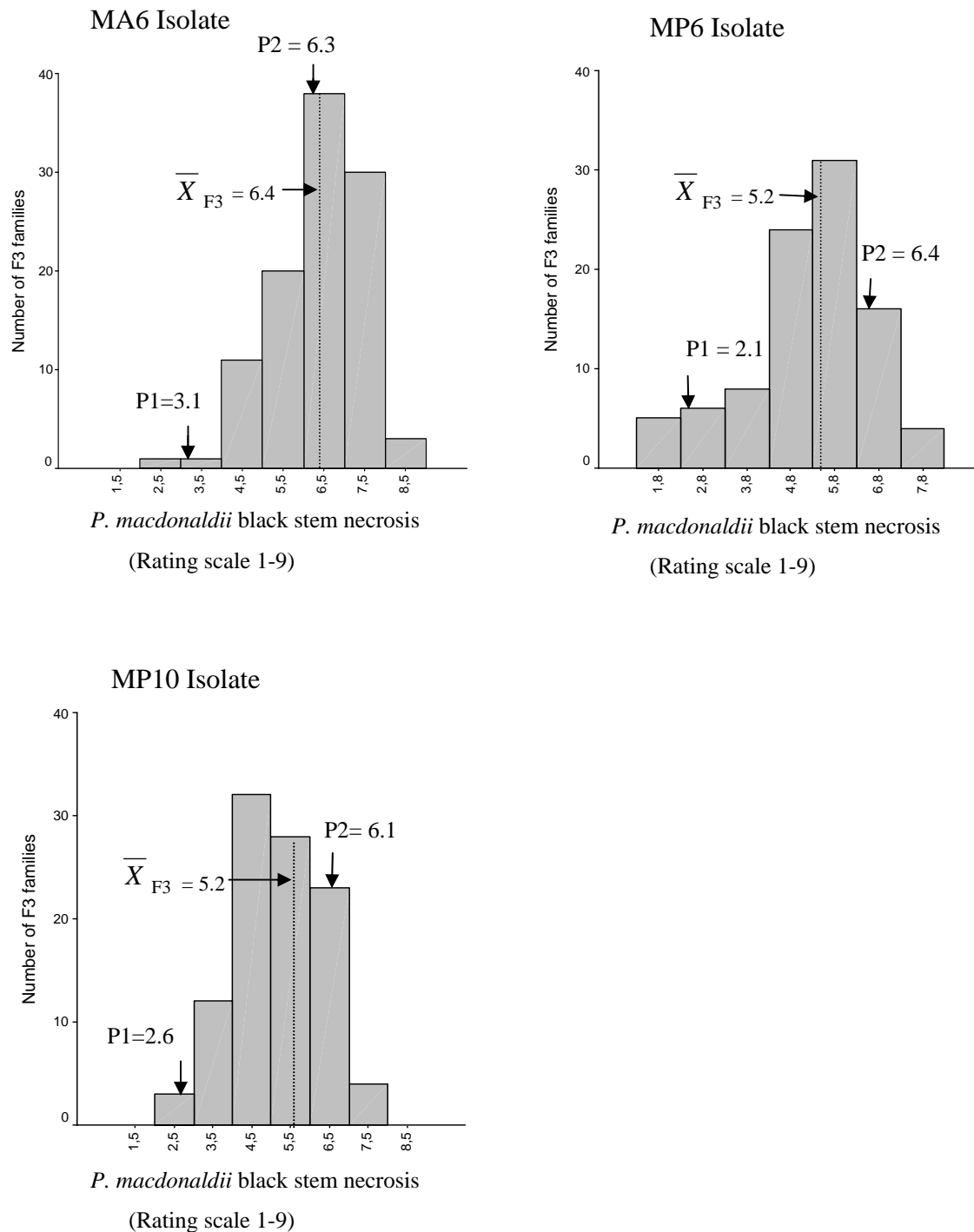


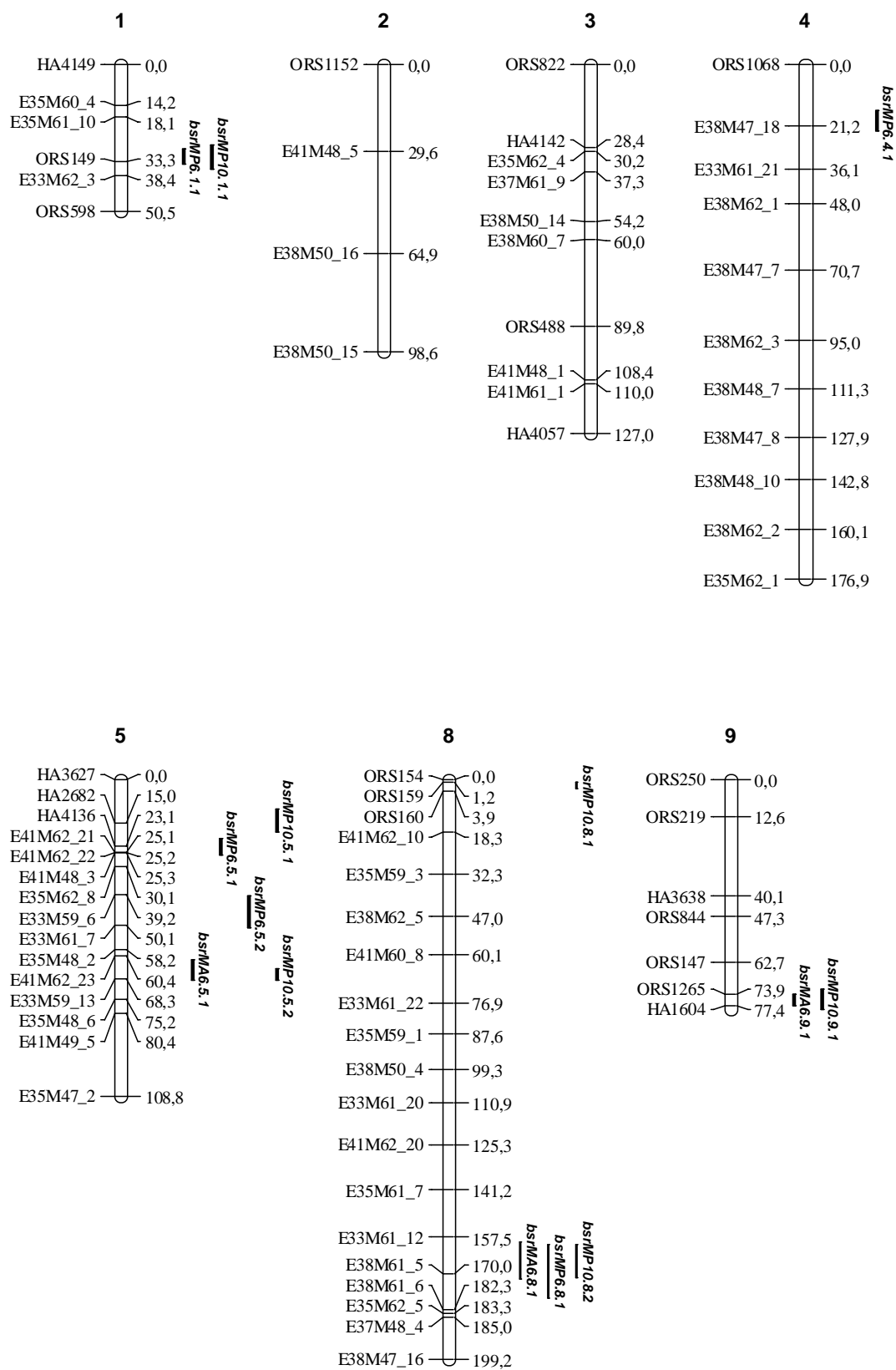
Figure 1 Frequency distribution of sunflower F3 families and their parents for partial resistance to *P. macdonaldii* isolates (MA6, MP6 and MP10), scored seven days after petiole inoculation based on the percentage of the petiole area exhibiting necrosis symptoms. *Arrows* show phenotypic values of parental lines (P1= M6-54-1 and P2= ENSAT-B4) to each *P. macdonaldii* isolate. *Dashed lines* indicate the overall means of F3 families.

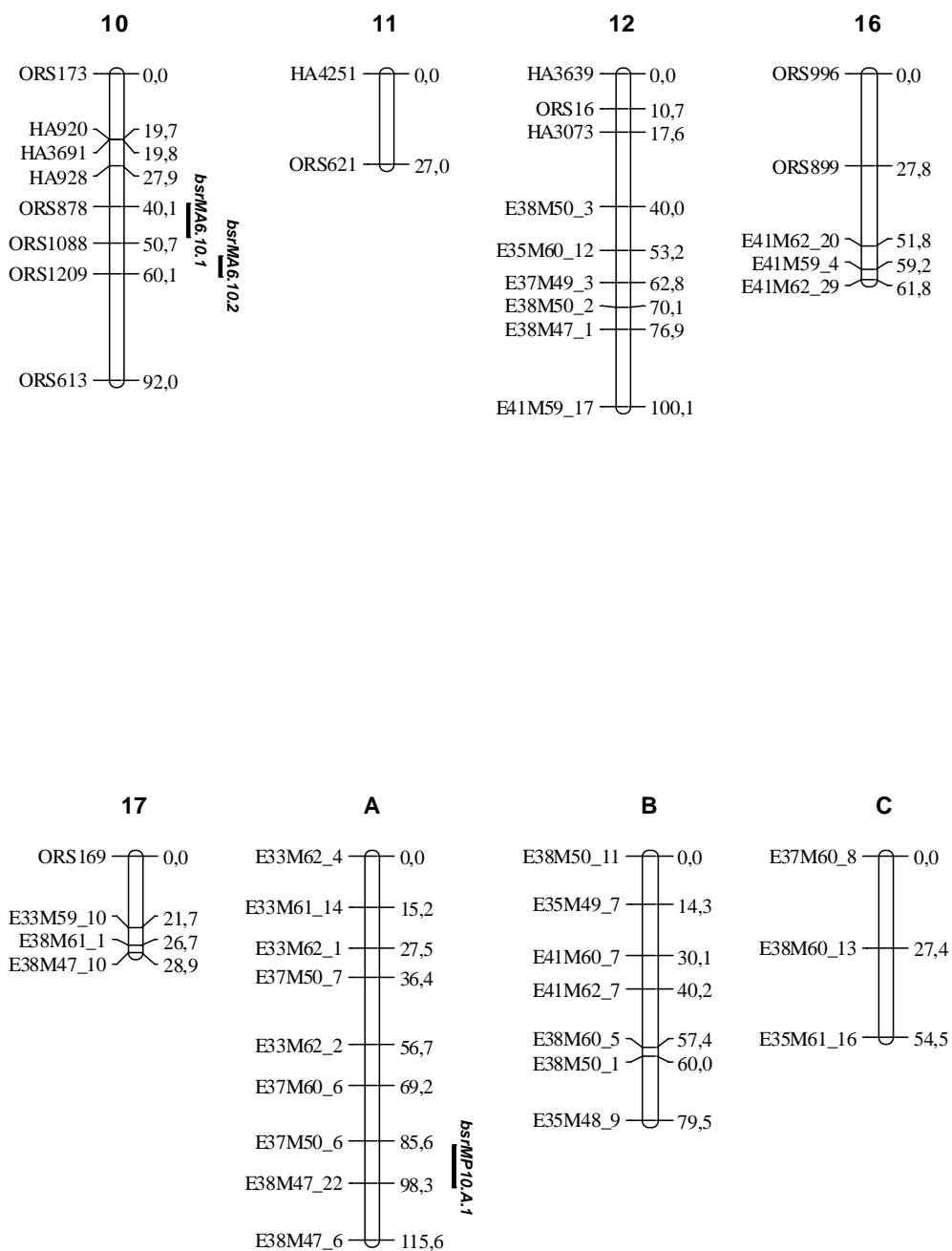
Table 3 QTLs detected for partial resistant to three *Phoma macdonaldii* isolates in sunflower F3 families using composite interval mapping (CIM). Markers linked to QTLs common for isolates are presented as *bold-face*.

Isolate	QTL	Linkage group	Marker	^a Position	LOD	Additive effect	Dominant effect	^b R ²
MA6	<i>bsrMA6.5.1</i>	5	E33M59_13	63.41	4.29	0.35	-0.80	0.17
	<i>bsrMA6.8.1</i>	8	E38M61_5	161.51	13.64	-0.61	1.29	0.42
	<i>bsrMA6.9.1</i>	9	HA1604	75.90	4.28	0.02	-0.41	0.04
	<i>bsrMA6.10.1</i>	10	ORS878	47.91	5.46	-0.04	-0.48	0.06
	<i>bsrMA6.10.2</i>	10	ORS1209	58.71	5.58	-0.17	-1.77	0.21
MP6	<i>bsrMP6.1.1</i>	1	ORS149	30.11	4.12	-0.46	0.46	0.08
	<i>bsrMP6.4.1</i>	4	E38M47_18	18.11	3.93	0.37	-0.67	0.04
	<i>bsrMP6.5.1</i>	5	E41M62_21	23.11	10.22	-0.82	-0.06	0.13
	<i>bsrMP6.5.2</i>	5	E33M61_7	48.21	3.97	0.26	0.47	0.04
	<i>bsrMP6.8.1</i>	8	E38M61_5	167.51	7.49	-0.76	1.55	0.34
MP10	<i>bsrMP10.1.1</i>	1	ORS149	30.42	7.18	-0.27	0.34	0.07
	<i>bsrMP10.5.1</i>	5	HA2682	13.10	14.79	0.21	0.68	0.12
	<i>bsrMP10.5.2</i>	5	E33M59_13	66.41	4.26	0.53	-0.25	0.10
	<i>bsrMP10.8.1</i>	8	ORS159	1.00	4.24	0.36	-0.14	0.04
	<i>bsrMP10.8.2</i>	8	E38M61_5	163.51	4.42	-0.43	0.76	0.18
	<i>bsrMP10.9.1</i>	9	HA1604	76.91	4.64	-0.043	-0.40	0.04
	<i>bsrMP10.A.1</i>	A	E38M47_22	90.61	6.59	-0.39	0.02	0.07

^a Expressed in Kosambi cM, from the north of the linkage group (LG)

^b Percentage of individual phenotypic variance explained, value determined by QTL Cartographer, version 1.16 (Basten *et al.* 2002)





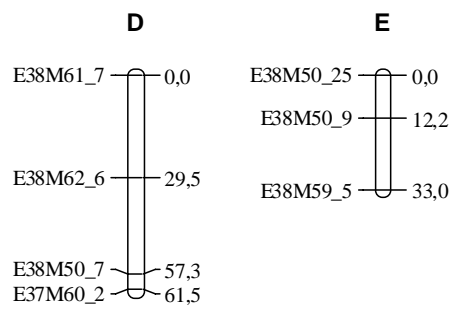


Figure 2 Genetic linkage map for sunflower based on 88 amplified fragment length polymorphism (AFLP) and 44 simple sequence repeat (SSR) markers. The positions of the QTLs are presented on the right side of the linkage groups. Bars represent intervals associated with the QTLs.

Quantitative trait loci associated with isolate specific and isolate nonspecific partial resistance to *Phoma macdonaldii* isolates in sunflower

R. Darvishzadeh, S. P. Kiani, G. Dechamp-Guillaume, L. Gentzbittel and A. Sarrafi*

Laboratoire de Biotechnologie et Amélioration des Plantes (BAP), IFR 40, INP-ENSAT, 18 Chemin de Borde Rouge, BP 32607, 31326 Castanet Tolosan, France

2 Black stem, caused by *Phoma macdonaldii*, is one of the most important diseases of sunflower in the world. Quantitative trait loci (QTLs) implicated in partial resistance to two single pycnidiospore isolates of *P. macdonaldii* (MP8 and MP10) were investigated using 99 recombinant inbred lines (RILs) from the cross between sunflower parental lines PAC2 and RHA266. The experimental design was a randomized complete block with three replications. High genetic variability and transgressive segregation were observed among RILs for partial resistance to *P. macdonaldii* isolates. QTL-mapping was performed using a recently developed high-density SSR/AFLP sunflower linkage map. A total of 10 QTLs were detected for black stem resistance. The phenotypic variance explained by each QTL (R^2) was moderate, ranging from 6 to 20%. Four QTLs were common between two isolates on linkage group 5 and 15 whereas the others were specific for each isolate. Regarding isolate specific and isolate nonspecific QTLs detected for partial resistance, it is evident that both genetic effects control partial resistance to the disease isolates. This confirms the need to consider different isolates in the black stem resistance breeding programmes. The four SSR markers HA3700, SSU25, ORS1097 and ORS523_1 encompassing the QTLs for partial resistance to black stem isolates could be good candidates for marker assisted selection.

Keywords: *helianthus annuus*, isolate specificity, partial resistance, QTL-mapping, sunflower black stem

Introduction

Phoma macdonaldii, the causal agent of black stem of sunflower is reported from different countries across the world. The disease has been spreading steadily since 1990 in France, and it is now the second most important sunflower disease after downy mildew (Alignan *et al.*, 2006). It causes premature ripening associated with yield losses of 10–30% (Penaud, 1996), and also reduction in oil content and thousand seed weight (Carson, 1991).

The fungus infects the plants by direct penetration or indirectly through wounds or plant structural openings such as lenticels and stomata (Roustae *et al.*, 2000a). To date, sunflower genotypes with different levels of resistance to this disease have been identified, but no fully resistant genotypes are available (Roustae *et al.*, 2000b).

Roustae *et al.* (2000b), using parental genotypes and their F_1 hybrids showed that the variation among genotypes studied was due to general combining ability and thus most of the variation was attributed to additive effects.

Recombinant inbred lines (RILs) were inoculated with an aggressive French isolate of *P. macdonaldii* and quantitative trait loci (QTLs) were identified (Rachid Al-Chaarani *et al.*, 2002). Bert *et al.* (2004), using F_2 - F_3 families, also detected QTLs controlling partial resistance to black stem. It has been recognized that significant differences in pathogenicity exist among different *P. macdonaldii* isolates on the same genetic material (Roustae *et al.*, 2000c). In the investigations cited above, the isolate specificity of partial resistance was not studied. Use of the QTL-approach to investigate isolate specificity of quantitative resistance has been reported in several research works (Leonards-Schippers *et al.*, 1994; Caranta *et al.*, 1997; Qi *et al.*, 1999; Arru *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2003; Calenge *et al.*, 2004; Cho *et al.*, 2004; Rocherieux *et al.*, 2004; Talukder *et al.*, 2004). Such an approach may throw light upon the existence of the minor-gene-for-minor-gene interaction for quantitative resistance postulated by Parlevliet & Zadoks (1977). The objective of the present study was to investigate isolate specificity and isolate nonspecificity of QTLs controlling partial resistance to two *P. macdonaldii* isolates using RILs coming from the cross between the sunflower parental lines, PAC2 and RHA266.

*E-mail: sarrafi@ensat.fr

Accepted 1 February 2007

Materials and methods

Sunflower genotypes and *P. macdonaldii* isolates

A set of 99 F₉ RILs derived from the cross between sunflower parental lines PAC2 and RHA266 was used in this study. The parental lines exhibit contrasting response in their partial resistance to two single pycnidiospore isolates of *P. macdonaldii* (MP8 and MP10) selected through our purified isolates for this experiment. MP8 and MP10 isolates were derived from naturally infected plants in southwest and central regions of France in 1996 (Roustaei *et al.*, 2000c). Conservation of isolates was achieved using the method described by Roustaei *et al.* (2000c).

Pathological tests and disease assessments

The responses of the RILs and parental lines to the two isolates were evaluated in two experiments. In each experiment the plant materials were inoculated by one of the selected isolates (MP8 and MP10). The experimental design was a randomized complete block with three replications. Each replication consisted of 10–12 seedlings. Pathological tests were performed using the method described by Darvishzadeh *et al.* (2007). Cotyledon petioles of seedlings were scored 7 days after inoculation according to the percentage of the petiole area exhibiting disease symptoms. A score of 1 (resistant) to 9 (susceptible) was given in relation to the proportion of petiole area showing necrosis as proposed by Roustaei *et al.* (2000b), where: 1 = 0–5%, 2 = 6–10%, 3 = 11–20%, 4 = 21–30%, 5 = 31–40%, 6 = 41–60%, 7 = 61–80%; 8 = 81–99% and 9 = 100%, with necrosis spreading down the stem.

Data analysis and QTL mapping

Analysis of variance (ANOVA) of the disease data were performed using the general linear model (GLM) procedure in the SAS software (SAS Institute Inc.). The function 'FREQ' of SPSS software (SPSS/PC-10, SPSS Inc.) was used to analyse the frequency distribution of RILs and their parents for partial resistance to each *P. macdonaldii* isolate, scored 7 days after inoculation of petioles. The mean of RILs and that of the parents was compared. Genetic gain when the mean of the 10% most resistant RILs was compared with the mean of their parents was determined. Additive and environmental variances as well as narrow-sense heritability were calculated according to Kearsley & Pooni (1996) using least-square estimates of genetic parameters.

The linkage map used in this study is the improved map described recently by Poormohammad Kiani *et al.* (2007). Briefly, the improved map has incorporated 157 new microsatellite markers compared with its old version (Rachid Al-Chaarani *et al.*, 2004). Each linkage group was numbered according to the sunflower reference map (Tang *et al.*, 2002) and is presumed to correspond to one of the 17 chromosomes in the haploid sunflower genome

($x = 17$). The total map length is 1824.6 cM with mean density of 3.7 cM per locus.

QTLs were detected using the composite interval mapping (CIM) by QTL Cartographer, version 1.16 with model 6 of Zmapqtl (Basten *et al.*, 2002) and a LOD score threshold of 3.0. This model integrates two parameters for CIM: the number of markers which control the genetic background ($n_m = 15$) and a window size ($w = 15$) that will block out a region of the genome on either side of the markers flanking the test site. The inclusion of background markers makes the analysis more sensitive to the presence of a QTL in the target interval. QTLs identified for the two isolates were compared on the basis of overlapping support intervals; a decrease in the LOD score of 1.0 determined the end point of support interval for each QTL. Additive effects of the detected QTLs, the percentage of phenotypic variation explained by each one (R^2) as well as the total phenotypic variation explained in the model of composite interval mapping (TR^2) were estimated using the Zmapqtl programme of QTL Cartographer (Basten *et al.*, 2002).

Results

Disease observation

ANOVA showed highly significant effects for genotypes while no significant difference was observed among replications (Table 1). Parental lines showed a contrasting level of partial resistance to isolates (Table 2). PAC2 presented higher significant level of partial resistance to the MP8 isolate. By contrast, RHA266 showed a higher significant partial resistance to the MP10 isolate. Differences between the mean of RILs (\bar{X} RILs) and the mean of parents (\bar{X} P) were not significant for both isolates (Table 2). Significant differences were observed when the mean of parents (\bar{X} P) was compared with the mean of 10% selected most resistant RILs (10%SRILs) (Table 2). Narrow-sense heritability was 0.47 and 0.46 for MP8 and MP10, respectively. Frequency distribution of RILs and their parents for partial resistance to both isolates shows continuous patterns, suggesting that partial resistance is controlled by a polygenic system (Fig. 1). For isolate

Table 1 Mean squares for disease severity score in sunflower recombinant inbred lines (RILs) and their two parents infected by *Phoma macdonaldii* in controlled conditions

Source of variation	d.f. ^a	MP8	MP10
Genotype	100	11.13*	10.97*
Block	2	0.28 ^{ns}	0.75 ^{ns}
Residual	200	0.30	0.33
Total	302	3.89	3.85

Coefficients of variation (CV) are 10.45 and 10.09 percent for MP8 and MP10 isolate, respectively.

^ad.f. = degrees of freedom.

* = Significant at 0.001 probability level; ^{ns} = non significance.

Table 2 Genetic gain and heritability for partial resistance to *Phoma macdonaldii* isolates (MP8 and MP10) in sunflower recombinant inbred lines (RILs)

Items	Isolates		Items	Isolates	
	MP8	MP10		MP8	MP10
PAC2 (P1)	2.54	6.40	$\bar{X}RILs^b - \bar{X}P^c$	0.86 ^{ns}	0.85 ^{ns}
RHA266 (P2)	6.20	3.30	10% SRILs ^d	1.88	1.96
P1-P2	-3.66*	3.10*	GG10% ^e = 10%SRIL - $\bar{X}P$	-2.46*	-2.89*
$\bar{X}P = (P1 + P2)/2$	4.37	4.85	LSD _{0.05}	0.89	0.92
$\bar{X}RIL$	5.20	5.70	g^{*h}	0.47	0.46

^aAverage disease severity score of genotypes challenged by *P. macdonaldii* isolates MP8 and MP10, 7 days postinoculation, in three replications, each containing 24 cotyledon petioles.

^b $\bar{X}RILs$: mean of all RILs.

^c $\bar{X}P$: mean of parents.

^d10%SRILs: mean of the 10% selected most resistant RILs.

^eGG10%: genetic gain when the mean of 10% selected RILs is compared with the mean of parents.

^fLSD_{0.05}: least significant differences calculated using $t_{0.05}$ and error mean square of each experiment.

^g h^2 : narrow-sense heritability.

* and ns: significant at 0.05 level and non-significant.

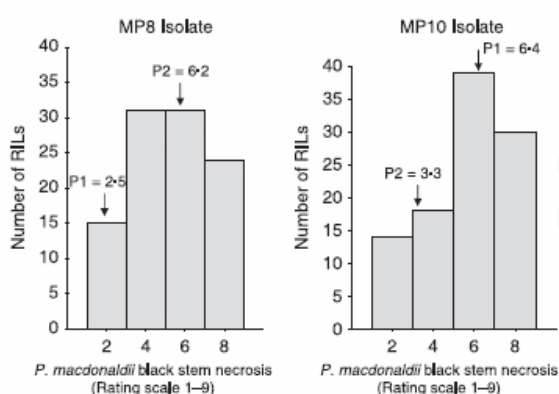


Figure 1 Frequency distribution of sunflower recombinant inbred lines (RILs) and their parents for partial resistance to *Phoma macdonaldii* isolates (MP8 and MP10), scored 7 days after petiole inoculation based on the percentage of the petiole area exhibiting necrosis symptoms. Arrows show phenotypic values of parental lines (P1 = PAC2 and P2 = RHA266) to each *P. macdonaldii* isolate. Rating scale: 1 = resistant; 9 = susceptible.

MP10 the distribution of mean disease severity score was skewed toward susceptibility indicating that MP10 was more aggressive than MP8 on these genotypes (Fig. 1).

QTL analysis

Significant peak values of LOD scores, the position of their peaks, the percentage of phenotypic variance explained (R^2) and the estimate of QTL effects based on a composite interval mapping for QTLs associated with partial resistance to two *P. macdonaldii* isolates are summarized in Table 3. QTLs were designated as *bsr* corresponding to black stem resistance followed by the isolate name, linkage group and QTL number, respectively. These QTLs were mapped on the sunflower genome

(Fig. 2). A total of 10 QTLs were detected for partial resistance to two isolates. QTLs involved in partial resistance to the MP8 isolate are located on linkage groups 5, 9, 11, 15 and 17; and those for partial resistance to MP10 are located on linkage groups 1, 2, 5 and 15. Through the 10 detected QTLs, four QTLs locating two by two on linkage groups 5 and 15 provide partial resistance to both isolates tested (Fig. 2). The phenotypic variance explained by each QTL (R^2) is moderate, ranging from 6 to 20%, whereas a high percentage of total phenotypic variance ($TR^2 = 63-80\%$) is explained for partial resistance to two isolates when considering all the covariants in composite interval mapping. The sign of additive gene effects showed that favourable alleles for partial resistance come from both parents.

Discussion

The RILs presented highly significant genetic variation for partial resistance to the two *P. macdonaldii* isolates used in this experiment (Table 1). Genetic variability for partial resistance to black stem has been previously reported in both field (Pérès *et al.*, 1994) and controlled conditions (Roustae *et al.*, 2000b; Rachid Al-Chaarani *et al.*, 2002; Bert *et al.*, 2004). The difference between the mean of RILs and the mean of parents was not significant indicating that RILs used in this study are representative of possible recombinations of the cross PAC2 \times RHA266 (Table 2). The significant difference between the mean of 10% selected most resistant RILs and the mean of parents, considered as genetic gain, is evidence for transgressive segregation for partial resistance to *P. macdonaldii* isolates (Table 2, Fig. 1). The positive and negative signs of additive effect at the different loci (Table 3) indicate the contribution of both parental lines to partial resistance and confirm the transgressive segregation observed at the phenotypic level. Transgressive segregation has previously been reported by Rachid Al-Chaarani *et al.* (2002) and

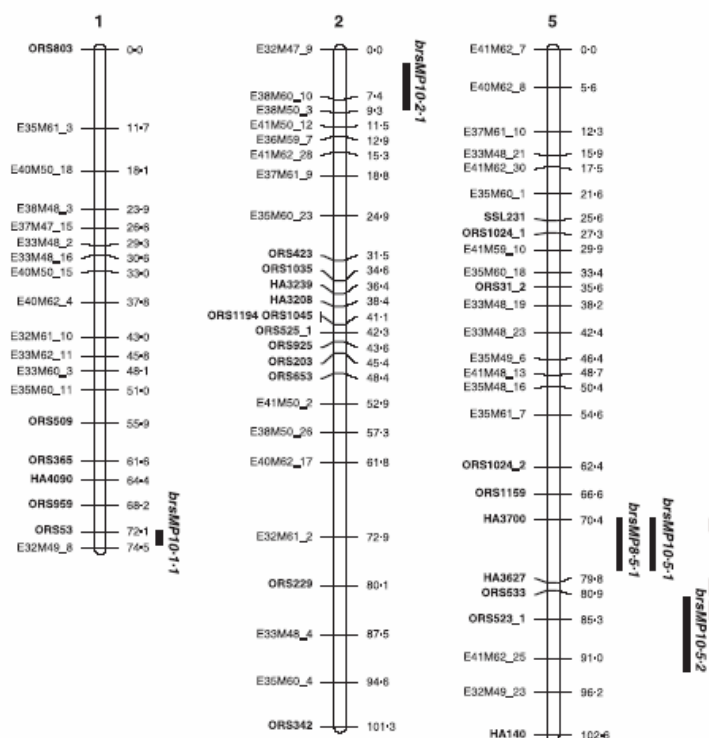


Figure 2 Linkage groups of the sunflower genome presenting QTLs for partial resistance to two isolates of *Phoma macdonaldii*. Vertical bars present the positions of QTLs. A decrease in the LOD score of 1.0, determined the end point of support interval for each QTL.

Bert *et al.* (2004) for partial resistance of sunflower to black stem with another isolate of *P. macdonaldii*. Narrow-sense heritability for partial resistance to MP8 and MP10 isolates was 0.47 and 0.46, respectively, which is similar to that presented by Rachid Al-Chaarani *et al.* (2002).

A total of 10 QTLs were detected for partial resistance to isolates MP8 and MP10 (Table 3). Among QTLs identified, three QTLs, *bsrMP8-9-1*, *bsrMP8-11-1* and *bsrMP8-17-1*, were only effective with isolate MP8 (isolate specific) and three, *bsrMP10-1-1*, *bsrMP10-2-1* and *bsrMP10-5-2* only with isolate MP10 (isolate specific). The other four QTLs were co-localizing (isolate nonspecific). One of the QTLs detected for the MP8 isolate (*bsrMP8-5-1*) was co-localized with a QTL of the MP10 isolate (*bsrMP10-5-1*) on linkage group 5 (Fig. 2). These two co-localizing QTLs are important as they explain 16 and 13% of phenotypic variance for partial resistance to MP8 and MP10 isolates respectively (Table 3). Other co-localizing QTLs (*bsrMP8-15-1* and *bsrMP10-15-1*) located on linkage group 15, explain 8% of phenotypic variance of partial resistance to the two isolates (Table 3, Fig. 2). The identified QTLs in this experiment have been detected in favourable conditions for disease development (Roustae *et al.*, 2000c). In another programme at this laboratory, an experiment has been repeated with 12 genotypes challenged by seven isolates in the same favourable environmental conditions and the difference between the two tests was not significant (Darvishzadeh *et al.*, 2007). However, any changes in experimental conditions affecting disease development, may have an

effect on QTLs. Favourable alleles of QTLs for the two isolates tested come from both parental lines indicating that they are dispersed between the parents. Research in other host-pathogen systems also showed that susceptible parents could contribute to increasing resistance of progeny lines to diseases as a result of transgressive segregation (Cherif & Harrabi, 1993; Thomas *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2003; Chartrain *et al.*, 2004).

So far, two studies have been undertaken for mapping QTLs controlling partial resistance to black stem disease in sunflower (Rachid Al-Chaarani *et al.* 2002; Bert *et al.* 2004). In both studies the French MP6 isolate was used. In the first study, using an AFLP map, Rachid Al-Chaarani *et al.* (2002) detected seven QTLs for partial resistance to black stem with moderate phenotypic variance (R^2) ranging from 6 to 17%, on linkage groups 3, 4, 8, 9, 11, 15 and 17, which correspond to linkage groups 1, 7, 16, 10, 14, 17 and 8, respectively, in the new improved map. One of the detected QTLs for partial resistance to the MP8 isolate in the study reported here (*bsrMP8-17-1*) was co-localized with a QTL for the MP6 isolate (*bsr15-1*) (Rachid Al-Chaarani *et al.*, 2002). In another study, using an RFLP/AFLP map of F_3 families, Bert *et al.* (2004) reported four QTLs for partial resistance of sunflower to black stem. However, the lack of SSR markers and common linkage group nomenclature in their map makes it difficult to compare the location of QTL detected in this study and those detected by Bert *et al.* (2004).

Other research on the host-pathogen interaction systems also indicated that some QTLs for quantitative

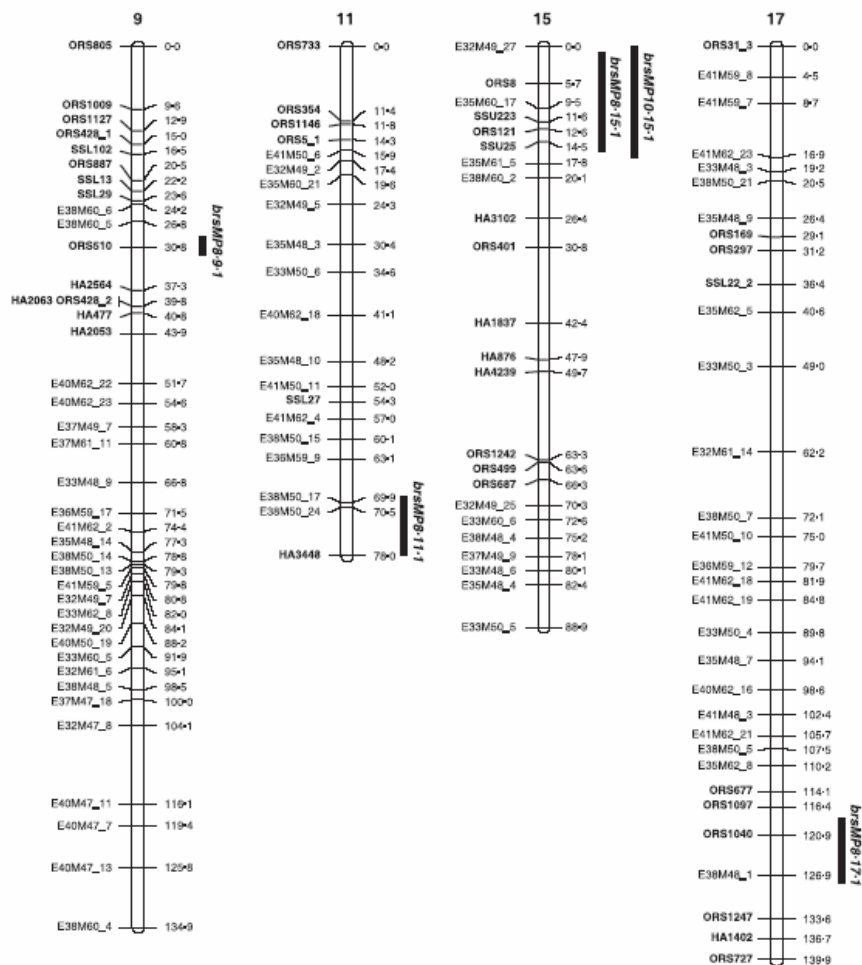


Figure 2 Continued

Table 3 QTLs detected for partial resistant to *Phoma macdonaldii* isolates in sunflower recombinant inbred lines (RILs) using composite interval mapping (CIM). Markers linked to QTLs common for two isolates are presented in bold

Isolate	QTL	Linkage group	Marker	^a Position	LOD	Additive effect	^b R ²	^c TR ²
MP8	<i>bsrMP8-5-1</i>	LG5	HA3700	74.30	4.2	0.91	0.16	0.72
	<i>bsrMP8-9-1</i>	LG9	ORS510	30.80	3.4	0.69	0.08	0.63
	<i>bsrMP8-11-1</i>	LG11	E38M50_24	76.50	4.8	0.81	0.14	0.69
	<i>bsrMP8-15-1</i>	LG15	SSU25	14.46	4.0	-0.63	0.08	0.65
	<i>bsrMP8-17-1</i>	LG17	ORS1097	120.40	5.5	-0.87	0.15	0.68
MP10	<i>bsrMP10-1-1</i>	LG1	ORS53	74.00	4.8	-0.64	0.06	0.72
	<i>bsrMP10-2-1</i>	LG2	E38M60_10	7.40	8.0	0.87	0.15	0.72
	<i>bsrMP10-5-1</i>	LG5	HA3700	76.40	4.8	0.75	0.13	0.73
	<i>bsrMP10-5-2</i>	LG5	ORS523_1	89.20	5.6	0.95	0.20	0.80
	<i>bsrMP10-15-1</i>	LG15	SSU25	14.46	4.9	-0.60	0.08	0.72

^aExpressed in Kosambi CM, from the north of linkage group (LG).^bPercentage of individual phenotypic variance explained, value determined by QTL Cartographer, version 1.16 (Basten *et al.* 2002).^cPercentage of phenotypic variance explained by the QTLs given all the covariants, determined by QTL Cartographer, version 1.16 (Basten *et al.*, 2002).

resistance were isolate specific. In the *Solanum tuberosum* – *Phytophthora infestans* system, six out of the 11 detected QTLs showed specificity to two *P. infestans* races (Leonards-Schippers *et al.*, 1994). The *Capsicum annuum*–Potyvirus host–pathogen system also showed isolate-specific effects for QTLs detected (Caranta *et al.*, 1997). Qi *et al.* (1999) found a similar situation for partial resistance to leaf rust in barley. They found three QTLs in common for effective resistance to two isolates at the adult stage and five remaining QTLs were isolate specific. In mapping QTLs for partial resistance to rice blast (*Magnaporthe grisea*) most of identified QTLs were isolate specific (Talukder *et al.*, 2004). Parlevliet (1976) reported small but significant genotype–isolate interactions in partially resistant barley lines to *Puccinia hordei*. This led him to propose the ‘minor-gene-for-minor-gene’ hypothesis to explain quantitative resistance. Indeed, the examples mentioned above together with the present data support this hypothesis. Several hypotheses have been addressed for the specificity effect of QTLs detected with different isolates (Rocherieux *et al.*, 2004). The resistance response implicates a great number of genes that could be interconnected and be required in different signalling pathways (Feys & Parker, 2000).

In conclusion, regarding isolate nonspecific and isolate specific QTLs detected for partial resistance to two *P. macdonaldii* isolates, it is suggested that both specific and nonspecific genes or genomic regions control partial resistance to *P. macdonaldii* isolates. The results of this study confirm the need to consider different isolates in the black stem resistance breeding programmes. Pyramiding isolate nonspecific together with isolate specific QTLs could increase the level of resistance to a wide range of isolates. SSR markers such as HA3700, SSU25, ORS1097 and ORS523_1, linked to QTLs for partial resistance to black stem isolates could be good candidates for marker-assisted selection.

Acknowledgement

The authors thank Professor Catherine Carter from South Dakota State University for English corrections.

References

- Alignan M, Hewezi T, Petitprez M, Dechamp-Guillaume G, Gentzbittel L, 2006. A cDNA microarray approach to decipher sunflower (*Helianthus annuus* L.) responses to the necrotrophic fungus *Phoma macdonaldii*. *New Phytologist* 170, 523–36.
- Arru L, Francia E, Pecchioni N, 2003. Isolate-specific QTLs of resistance to leaf stripe (*Pyrenophora graminea*) in the ‘Steptoe’ × ‘Morex’ spring barley cross. *Theoretical and Applied Genetics* 106, 668–75.
- Basten CJ, Weir BS, Zeng Z-B, 2002. *QTL Cartographer, version 1-16: Program in Statistical Genetics*. Raleigh, NC, USA: North Carolina State University.
- Bert P-F, Dechamp-Guillaume G, Serre F *et al.*, 2004. Comparative genetic analysis of quantitative traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.). 3. Characterisation of QTL involved in resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Phoma macdonaldii*. *Theoretical and Applied Genetics* 109, 865–74.
- Calenge F, Faure A, Goerre M *et al.*, 2004. A QTL analysis reveals both broad-spectrum and isolate-specific QTL for scab resistance in an apple progeny challenged with eight isolates of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 94, 370–9.
- Caranta C, Lefebvre V, Palloix A, 1997. Polygenic resistance of pepper to potyviruses consists of a combination of isolate-specific and broad-spectrum quantitative trait loci. *Molecular Plant–Microbe Interactions* 10, 872–8.
- Carson ML, 1991. Relationship between phoma black stem severity and yield losses in hybrid sunflower. *Plant Disease* 75, 1150–3.
- Chartrain L, Brading PA, Widdowson JP, Brown JKM, 2004. Partial resistance to septoria tritici blotch (*Mycosphaerella graminicola*) in wheat cultivars Arina and Riband. *Phytopathology* 94, 497–504.
- Chen H, Wang S, Xing Y, Xu C, Hayes PM, Zhang Q, 2003. Comparative analyses of genomic locations and race specificities of loci for quantitative resistance to *Pyricularia grisea* in rice and barley. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 100, 2544–9.
- Cherif M, Harrabi M, 1993. Transgressive segregation for resistance to *Pyrenophora teres* in barley. *Plant Pathology* 42, 617–21.
- Cho S, Chen W, Muchlbauer FJ, 2004. Pathotype-specific genetic factors in chickpea (*Cicer arietinum* L.) for quantitative resistance to ascochyta blight. *Theoretical and Applied Genetics* 109, 733–9.
- Darvishzadeh R, Dechamp-Guillaume G, Hewezi T, Sarrafi A, 2007. Genotype-isolate interaction for resistance to black stem in sunflower (*Helianthus annuus*). *Plant Pathology* 56, x–y.
- Feys BJ, Parker JE, 2000. Interplay of signalling pathways in plant disease resistance. *Trends in Genetics* 16, 449–55.
- Kearsey MJ, Pooni HS, 1996. *The Genetical Analysis of Quantitative Traits*. London, UK: Chapman and Hall.
- Leonards-Schippers C, Gieffers W, Schäfer-Pregl R *et al.*, 1994. Quantitative resistance to *Phytophthora infestans* in potato: a case study for QTL mapping in an allogamous plant species. *Genetics* 137, 67–77.
- Parlevliet JE, 1976. Evaluation of the concept of horizontal resistance by the barley/*Puccinia hordei* host-pathogen relationship. *Phytopathology* 66, 494–7.
- Parlevliet JE, Zadoks JC, 1977. The integrated concept of disease resistance: a new view including horizontal and vertical resistance in plants. *Euphytica* 26, 5–21.
- Penaud A, 1996. Phoma du tournesol: Recherche des époques de contamination et mise au point de la protection fongicide. In: *Proceedings of the 14th International Sunflower Conference Beijing, China*. Paris, France: International Sunflower association, 694–9.
- Péres A, Allard AM, Deverchère J, Penaud A, 1994. Phoma du tournesol: étude de la protection fongicide au champ. In: *4ème Conférence Internationale Sur les Maladies Des Plantes, Bordeaux, France*. Paris, France: ANPP, 1179–85.
- Poormohammad Kiani S, Talia P, Maury P *et al.*, 2007. Genetic analysis of plant water status and osmotic adjustment in recombinant inbred lines of sunflower under two water treatments. *Plant Science* doi:10.1016/j.plantsci.2006.12.007.

- Qi X, Jiang G, Chen W, Niks RE, Stam P, Lindhout P, 1999. Isolate-specific QTLs for partial resistance to *Puccinia hordei* in barley. *Theoretical and Applied Genetics* 99, 877–84.
- Rachid Al-Chaarani G, Gentzbittel L, Huang, XQ, Sarrafi A, 2004. Genotypic variation and identification of QTLs for agronomic traits, using AFLP and SSR markers in RILs of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theoretical Applied Genetics* 109, 1353–60.
- Rachid Al-Chaarani G, Roustace A *et al.*, 2002. A QTL analysis of sunflower partial resistance to downy mildew (*Plasmopara halstedii*) and black stem (*Phoma macdonaldii*) by the use of recombinant inbred lines (RILs). *Theoretical and Applied Genetics* 104, 490–6.
- Rocherieux J, Glory P, Giboulot A *et al.*, 2004. Isolate-specific and broad-spectrum QTLs are involved in the control of clubroot in *Brassica oleracea*. *Theoretical and Applied Genetics* 108, 1555–63.
- Roustace A, Barrault G, Dechamp-Guillaume G, Gelie B, Savy C, Dargent R, Barrault G, 2000a. Ultrastructural studies of the mode of penetration by *Phoma macdonaldii* in sunflower seedlings. *Phytopathology* 90, 915–20.
- Roustace A, Barrault G, Dechamps-Guillaume G, Lesigne P, Sarrafi A, 2000b. Inheritance of partial resistance to black stem (*Phoma macdonaldii*) in sunflower. *Plant Pathology* 49, 396–401.
- Roustace A, Costes D, Dechamp-Guillaume G, Barrault G, 2000c. Phenotypic variability of *Leptosphaeria lindquistii* (anamorph: *Phoma macdonaldii*), a fungal pathogen of sunflower. *Plant Pathology* 49, 227–34.
- Talukder ZI, Tharreau D, Price AH, 2004. Quantitative trait loci analysis suggests that partial resistance to rice blast is mostly determined by race-specific interactions. *New Phytologist* 162, 197–209.
- Tang S, Yu JK, Slabaugh MB, Shintani DK, Knapp SJ, 2002. Simple sequence repeat map of the sunflower genome. *Theoretical and Applied Genetics* 105, 1124–36.
- Thomas WTB, Powell W, Waugh R *et al.*, 1995. Detection of quantitative trait loci for agronomic, yield, grain and disease characters in spring barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 91, 1037–47.
- Zhu S, Leonard KJ, Kaeppler HF, 2003. Quantitative trait loci associated with seedling resistance to isolates of *Puccinia coronata* in oat. *Phytopathology* 93, 860–6.

Genetic variation and identification of molecular markers associated with partial resistance to black stem in gamma-irradiation induced mutants in sunflower (*Heliantus annuus* L.)

R. Darvishzadeh, S. Poormohammad Kiani, T. Huguet, and A. Sarrafi *

Department of Biotechnology and Plant breeding, BAP-ENSAT, 18 Chemin de Borde Rouge, BP-32607, 31326 Castanet-Tolosan, France

Darvishzadeh et al. (2007d). Canadian Journal of Plant Pathology (Soumis)

*Corresponding author: Professor A. Sarrafi

Department of Biotechnology and Plant breeding, BAP-ENSAT, 18 Chemin de Borde Rouge, BP-32607, 31326 Castanet-Tolosan, France

E-mail: Sarrafi@ensat.fr

Phone: +33 5 62193580

Fax: +33 5 62193581

Abstract

The present study was undertaken to evaluate the genetic variability among gamma-irradiation induced sunflower mutant lines for partial resistance to Phoma black stem and also to identify putative molecular markers associated with partial resistance to Phoma black stem. A population of 60 mutants and their original line 'AS-613' were evaluated with an aggressive French isolate of *Phoma macdonaldii* (MP6) in controlled conditions. The experimental design was a completely randomized block with three replications. Variability on partial resistance and molecular markers, generated with 17 AFLP primer combinations was estimated. Some mutant lines were identified that consistently showed an altered Phoma black stem resistance. Generation mean analysis revealed that dominant effect toward susceptibility contributed significantly to the inheritance of Phoma black stem resistance. Using multiple regression analysis, eight AFLP markers associated with partial resistance to Phoma black stem were identified. Prediction of the performance of all mutants for susceptibility to the disease based upon their marker profiles showed that none of them differed significantly from the observed values. These results provide interesting information for marker-assisted selection.

Key words: AFLP - disease resistance - genetic variation – induced mutants - *Phoma macdonaldii*

Introduction

Phoma black stem caused by *Phoma macdonaldii* is the second most important sunflower disease in France after downy mildew (Alignan et al. 2006). Utilization of sunflower cultivars with improved Phoma black stem resistance is an effective way to control the disease. Genetic variability for partial resistance to Phoma black stem in sunflower has been reported both in the field (Pérès et al. 1994) and under controlled conditions (Roustae et al. 2000a, Rachid Al-Chaarani et al. 2002, Bert et al. 2004). The inheritance of partial resistance of sunflower to *P. macdonaldii* was reported to be quantitative, under additive and dominant gene effects (Roustae et al. 2000a). In two independent studies under controlled conditions using seedling test, a significant number of quantitative trait loci (QTLs) for partial resistance to Phoma black stem confirming the polygenic nature of resistance, were identified (Rachid Al-Chaarani et al. 2002; Bert et al. 2004). Larfeil (2003) has reported that the susceptibility of sunflower to Phoma black stem is similar under the field and controlled conditions. The disease severity on the seedling stage is the same as in the adult plant stage (Roustae et al. 2000a; Larfeil 2003). In other hand, it has been recognized that significant differences in pathogenicity exist among different *P. macdonaldii* isolates (Roustae et al. 2000b). Breeding for more durable resistant cultivar, therefore, should become a priority in sunflower improvement. Exploitation of new resistance genes, a combination of major genes and accumulation of polygenes, are considered the effective methods against Phoma black stem damages.

Induced mutation is considered as a supplement to natural genetic variability. Intensive work has been done on the induction of mutations by using irradiation, chemicals and other mutagenic agents in different species. Gamma rays have been employed to develop the radiation-induced mutants (Maluszynski et al. 2000). Induced mutants may have genes not previously identified at the mutational level, or may have novel alleles of previously

described genes (Robles and Micol 2001). Mutants showing resistance to fungal pathogens have been identified in some crops, for example, yellow and brown rust resistance in wheat (Boyd et al. 2002), blast resistance in rice (Zhang et al. 2003; Han et al. 2004) as well as *Ascochyta* blight and *Fusarium* wilt resistance in chickpea (Ahloowalia et al. 2004).

Plants selected on the basis of phenotypic traits alone may not always give the desired results as the phenotypic traits are highly influenced by environmental conditions. Hence, genetically more reliable marker systems like molecular markers are increasingly being used to assess the genetic variability among crop plants. Several studies have proved the usefulness of AFLP markers for genetic variability analysis in sunflower (Hongtrakul et al. 1997; Holder et al. 1998; Quagliaro et al. 2001; Liu et al. 2003).

Selecting desirable genotypes through marker-assisted selection has proved to be very effective in improving the genetic make-up of crop plants. However, the success of marker-assisted selection largely depends on the extent of genetic linkage between markers and the relevant loci such as QTL (Virk et al. 1996). Mapping of QTLs is usually carried out with materials obtained for systematic breeding such as F₂, back cross progenies or recombinant inbred lines (RILs). Identification of markers associated with different traits through multiple regression analysis in a group of genotypes showing high genetic variability offers an alternative mean, as has been adopted in several plant species such as RAPD in rice (Virk et al. 1996) and barley (Dawson et al. 1993), SSR and AFLP in bread wheat (Roy et al. 2006) and ISSR in mulberry (Vijayan et al. 2006).

The objectives of this study were to evaluate the genetic variability for partial resistance to Phoma black stem in sunflower mutant lines and to identify putative molecular markers associated with partial resistance to the disease using multiple regression analysis.

Materials and methods

Seedling resistance experiment

The sunflower inbred line 'AS613' has been created in our laboratory from a cross between two genotypes (ENSAT-125 and ENSAT-704) through a single seed descent (SSD) programme for its high organogenesis response (Sarraf et al. 2000). 1500 seeds of 'AS613', which were obtained following 8 generations of controlled self-pollination, were exposed to gamma irradiation at the Atomic Energy Center (Cadarache, France), with a dose of 75 Grays. Irradiated seeds were grown in the field and M1 plants were self-pollinated. Among a population of about 3000 M2 plants, fertile mutants presenting agronomical advantage or disadvantage compared with original line (AS613) were selected and self-pollinated in order to produce the M3 progenies. In each M3 line, 1-3 individual plants were selected and self-pollinated. Selection was applied in the same way for M4, M5 and M6 generations. From 2000 M6 mutant lines, a population of 60 mutants showing morphological difference and also a high variability for resistance to Phoma black stem compared with the original line were used in this study. The experimental design was a completely randomized blocks with three replications. Seeds were surface sterilized for 5 min in a sodium hypochlorite solution (6 chlorometric degrees) and washed in sterile distilled water. Two rows of six seeds per genotype per replication were sown in plastic containers filled with horticulture substrate (Hawita Flor, Germany; <http://www.hawita-gruppe.de/>) and transferred to growth chamber (14 h photoperiod) and $25 \pm 1^{\circ}\text{C}/18 \pm 1^{\circ}\text{C}$ light / dark temperature with a light intensity of $200 \mu\text{E.m}^{-2} \text{s}^{-1}$ provided by NAV-T 600W lamps Osram-Vialox, Molsheim, France under 75-80% relative humidity. The response of mutant lines was evaluated with an aggressive French isolate of *P. macdonaldii* (MP6) (Roustae et al. 2000b). 'MP6' isolate was grown on Potato Dextrose Agar Medium at $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ in 12h photoperiod ($37 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). After a ten-days incubation period, pycniospore suspension was obtained by addition of sterile distilled water

at the surface of the culture and mechanical mixing. Twenty microliters of spore suspension containing 10^6 pycniospores/mL in water, 0.5% orange juice and 0.25% gelatine were deposited at the intersection of cotyledon petiole and hypocotyl of two-leaf-stage sunflower seedlings. During the first 48h following inoculation, seedlings were covered with a transparent cover (Plexiglas) to maintain nearly saturated humidity, favorable for fungal development. Both cotyledon petioles of seedlings were scored seven days after inoculation according to the percentage of the petiole area exhibiting disease symptoms. A score of 1 (resistance) to 9 (susceptible) was given in relation to the proportion of petiole area showing necrosis as proposed by Roustaei et al. (2000a), where: 1= 0-5%, 2 = 6-10%, 3 = 11-20%, 4 = 21-30%, 5 = 31-40%, 6 = 41-60%, 7 = 61-80%; 8 = 81-99% and 9 = 100%, with necrosis spreading down the stem.

Genetic analysis for partial resistance

Crosses were made between 'M6-54-1', a partial resistant mutant and 'ENSAT-B4' genotype, susceptible to Phoma black stem. Parental lines as well as F_1 , F_2 , BC_1 and BC_2 generations were used in a randomized complete block design with three replications. The number of seedling per replication was 10 for non-segregating genotypes (P_1 , P_2 and F_1), 60 for F_2 and 40 for backcrosses populations. Seedlings were inoculated with the method explained for seedling resistance experiment.

DNA extraction and AFLP assays

The genomic DNA of original line 'AS613' and M6 mutant lines were extracted from two-week old seedlings according to the method of extraction and purification presented by Fulton et al. (1995). Different MseI/EcoRI primer combinations were used for AFLP genotyping (Table1). The AFLP procedure was conducted as described by Rachid Al-Chaarani et al. (2004).

Statistical analysis

The significance of variability among genotypes for partial resistance to Phoma black stem was tested through ANOVA using the general linear model (GLM) procedure in the SAS software (SAS Institute Inc, NC, USA). The Student-Newman-Keuls test was used for comparing disease severity score means. Additive and dominance (non-additive) genetic variances as well as narrow-sense heritability (h^2) were estimated following the method presented by Warner (1952). Environmental variance was calculated as $S^2_E = (S^2_{P1} + S^2_{P1+2S^2_{F1}})/4$ (Mather and Jinks, 1982). Association between AFLP markers and the disease severity score was estimated through stepwise multiple regression analysis, where disease severity score was treated as a dependent variable while the AFLP markers were used as independent variables (Vijayan et al., 2006). Prediction of the susceptibility values of the mutant lines to Phoma black stem was performed using AFLP marker profiles and the constructed regression model.

Results

Genetic analysis of partial resistance

Analysis of variance showed significant variability ($P = 0.01$) between mutant lines for partial resistance to Phoma black stem, whereas no significant effect was observed among replications (data not presented). Mean severity scores of parental lines, F₁, F₂ and backcross generations for partial resistance to Phoma black stem summarized in Table 2 show that ‘M6-54-1’ was highly resistant (low disease severity score), while ‘ENSAT-B4’ was highly susceptible to Phoma black stem (high disease severity score). The F₁ seedlings were all susceptible. The F₂ and back cross seedlings were either resistant or susceptible with the majority of seedling being susceptible (Fig. 1). Frequency distribution of the F₂, BC₁ and BC₂ genotypes for partial resistance to Phoma black stem show continuous patterns, suggesting that resistance is controlled by a polygenic system (Fig. 1). It can be seen, by considering the

position of parental means on these distributions, that there is considerable transgressive segregation in all cases, indicating that favourable alleles are dispersed among the parents (Fig. 1). This, again, implies two or more QTL for such trait. The estimates of the genetic effects and their magnitudes based on the six-parameter model are presented in Table 2. Additive effects were not significant whereas dominant effects were significant and positive (toward the susceptible parent). Epistasis effects; additive \times additive, additive \times dominant and dominant \times dominant were significant. Broad-sense heritability was high (63%) whereas narrow-sense heritability has a lower value (31%).

Association study

The number of polymorphic markers varied from 8 to 27 for primer combinations (Table 1). Eight AFLP markers associated with partial resistance to Phoma black stem were identified through multiple regression analysis. The effect of AFLP markers varied from 3.6 to 16.32% (Table 3). The eight AFLP markers detected explained 64.36% of the total phenotypic variance of partial resistance to Phoma black stem (Table 3).

Discussion

The large genetic variation observed among mutant lines for partial resistance to Phoma black stem revealed the efficiency of gamma-irradiation for inducing genetic variation in sunflower for resistance to the disease (Table 4). Gamma-irradiation induced mutants, resistant to fungal pathogens, have been also identified for stem and stripe rust resistance in wheat (Skorda 1977), *Phytophthora* blight resistance in sesame (Pathirana 1992), blast resistance in rice (Zhang et al. 2003; Han et al. 2004), as well as *Ascochyta* blight and *Fusarium* wilt resistance in chickpea (Ahloowalia et al. 2004). In sunflower, gamma-irradiation has been used for inducing genetic variation for different characters such as morphological traits (Nabipour et al. 2004) and germination traits (Alejo-Jaimes et al. 2004).

Generation mean analysis revealed that the F_1 seedlings were all susceptible (Table 2) indicating recessive inheritance of the gene(s) controlling partial resistance to Phoma black stem in the mutant line 'M6-54-1'. The reaction of the F_2 , BC_1 and BC_2 seedlings to Phoma black stem confirmed recessive inheritance of the gene(s) controlling partial resistance (Fig. 1). Our result showed that dominant effect toward susceptibility contributed significantly to the inheritance of Phoma black stem resistance. The major contribution to variation by dominant gene effects is indicated by the relative magnitude of parameter [d] to parameter [m]. The six-parameter model revealed that epistatic effects contributed significantly to genetic variation of Phoma black stem resistance in the studied cross. Additive-by-additive interaction was significant and positive suggesting a reducing effect in the expression of Phoma black stem resistance. On the other hand, additive-by-dominant and dominant-by-dominant interactions were significant and negative, indicating their enhancing effect in the expression of Phoma black stem resistance. Studies on other plant-pathogen interactions also showed that epistatic interactions play an important role in the expression of resistance to disease (Lefebvre and Palloix, 1996; Olatinwo et al. 1999; Manzanares-Dauleux et al. 2000). Narrow-sense heritability estimate (31%) was less than broad-sense heritability estimate (61%). The low narrow-sense heritability certainly has been caused by small additive variance related to other variance components and large epistatic effects shown in the generation mean analysis (Table 2). Genetic variability and high heritability (0.67) for partial resistance to black stem in F_1 hybrids and their parental lines as well as dominant genes effects were also reported by Roustae et al. (2000a). It is evident that the magnitude of non-allelic interactions and absolute total of non-fixable gene effects (dominant, additive-by-dominant and dominant-by-dominant) were greater than the fixable effects (additive and additive-by-additive gene effects). Considering contribution of non-additive gene effects toward susceptibility in controlling partial resistance in the studied cross combined with rather small narrow-sense

heritability, selecting for Phoma black stem resistance in segregating population should be complex.

Results concerning association between AFLP markers and partial resistance to Phoma black stem are presented in Table 3. The cumulative effects of the 8 significant markers (R^2) explained 64.36% of the phenotypic variation. Three markers, 'E33M61-8', 'E33M48-5', 'E33M60-6' explained substantial proportions of variation in susceptibility to Phoma black stem. Prediction of the performance of all mutant lines used in our study for susceptibility to Phoma black stem based upon their marker profiles resumed in Table 4 show that none of the 61 predictions differed significantly from the observed values demonstrating good accordance between them for all mutant lines. The correlation between the observed and predicted susceptibility values to Phoma black stem was also highly significant ($r= 0.84$, $P<0.001$). The difference between the mean of 10% selected most resistant mutant lines ($\%10SM6=3.59$), and the mean of the original line 'AS613' ($\bar{X} = 7.19$), considered as genetic gain, is significant ($GG10\% = -3.61$, $P<0.05$). Multiple regression analysis has been used to identify molecular markers associated with different traits in several species. Vijayan et al. (2006) identified several ISSR markers associated with yield traits in mulberry. AFLP markers associated with agronomic traits in 55 bread wheat genotypes were recognized by Roy et al. (2006). However, markers identified in the present study needs to be subjected to validation.

In conclusion, we have identified some mutants, which are more resistant than the original line to Phoma black stem. The AFLP markers associated with partial resistance to Phoma black stem identified and confirmed by their predicted values provide interesting information for marker-assisted selection.

References

- Alejo-Jaimes, A., Jardinaud, M.F., Maury, P., Alibert, G., Gentzbittel, L., Sarrafi, A., Grieu, P., and Petitprez, M. 2004. Genetic variation for germination and physiological traits in sunflower mutants induced by gamma rays. *J. Genet. Breed.* 58: 285-294.
- Ahloowalia, B.S., Maluszynski, M., and Nichterlein, K. 2004. Global impact of mutation-derived varieties. *Euphytica* 135: 187-204.
- Alignan, M., Hewezi, T., Petitprez, M., Dechamp-Guillaume, G., and Gentzbittel, L. 2006. A cDNA microarray approach to decipher sunflower (*Helianthus annuus* L.) responses to the necrotrophic fungus *Phoma macdonaldii*. *New Phytol.* 170: 523-536.
- Bert, P-F., Dechamp-Guillaume, G., Serre, F., Jouan, I., Tourvieille de Labrouhe, D., Nicolas, P., and Vear, F. 2004. Comparative genetic analysis of quantitative traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.) 3. Characterisation of QTL involved in resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Phoma macdonaldii*. *Theor. Appl. Genet.* 109: 865-874.
- Boyd, L.A., Smith, P.H., Wilson, A.H., and Minchin, P.N. 2002. Mutation in wheat showing altered field resistance to yellow and brown rust. *Genome* 45: 1035-1040.
- Dawson, J.K., Chalmers, K.J., Waugh, R., and Powell, W. 1993. Detection and analysis of genetic variation in *Hordeum spontaneum* populations from Isreal using RAPD markers. *Mol. Ecol.* 2: 151-159.
- Fulton, T.M., Chunwongse, J., and Tanksley, S.D. 1995. Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. *Plant Mol. Biol. Report.* 13: 207-209.
- Han, C.U., Lee, C.H., Jang, K.S., Choi, G.J., Lim, H.K., Kim, J.C., Ahn, S.N., Choi, J.E., Cha, J.S., Kim, H.T., Cho, K.Y. and Lee, S.W. 2004. Identification of rice genes induced in a rice blast-resistant mutant. *Mol. Cells* 17: 462-468.

- Holder, E., Hahn, V., Schwall, M., Knapp, S.J., and Melchinger, A.E. 1998. Genetic diversity in sunflower: Comparison of pedigree and AFLP data. *Vorträge f. Pflanzenzüchtung* 42: 119-121
- Hongtrakul, V., Huestis, G.M., and Knapp, S.J. 1997. Amplified fragment length polymorphisms as a tool for DNA fingerprinting sunflower germplasm: Genetic diversity among oilseed inbred lines. *Theor. Appl. Genet.* 95: 400–407.
- Larfeil, C. 2003. The black stem disease of sunflower caused by *Phoma macdonaldii* Boerema: phenotypic and molecular variability, genotypes susceptibility evaluation to the disease and modality of infection. Ph.D. Thesis, National Polytechnical Institute, Toulouse, France <http://bap.ensat.fr/pages/publications/publications.htm>
- Lefebvre, V., and Palloix, A. 1996. Both epistatic and additive effects of QTLs are involved in polygenic induced resistance to disease: a case study, the interaction pepper *Phytophthora capsici* Leonian. *Theor. Appl. Genet.* 93: 503-511.
- Liu, J., Liu, G.S., and Jan, C.C. 2003. Comparison of genetic diversity of the germplasm resources of confectionary sunflower (*Helianthus annuus* L.) in China based on RAPD and AFLP. *Acta Bot. Sin.* 45: 352-358
- Maluszynski, M., Nichterlein, K., van Zanten, L., and Ahloowalia, B.S. 2000. Officially released mutant varieties - the FAO/IAEA Database. *Mut. Breed. Rev.* 12: 1–84.
- Manzanares-Dauleux, M.J., Delourme, R., Baron, F., and Thomas G. 2000. Mapping of one major gene and of QTLs involved in resistance to clubroot in *Brassica napus*. *Theor. Appl. Genet.* 101: 885-891.
- Mather, K., and Jinks, J.L., 1982. Biometrical genetics. Chapman & Hall, London.
- Nabipour, A., Yazdi-Samadi, B., and Sarrafi, A. 2005. Genetic control of some morphological mutant in sunflower. *J. Genet. Breed.* 58: 157-162.

- Olatinwo, R., Cardwell, K., Menkir A., Deadman M. and Julian, A. 1999. Inheritance of resistance to *Stenocarpella macrospora* (Earle) ear rot of maize in the mid-altitude zone of nigeria. Eur. J. Plant Pathol. 105 : 535-543.
- Pathirana, R. 1992. Gamma ray-induced field tolerance to *Phytophthora* blight in sesame. Plant Breed. 108: 314-319
- Pérès, A., Allard, A.M., Deverchère, J., Penaud, A., 1994. Phoma du tournesol: étude de la protection fongicide au champ. In: 4^{ème} Conference Internationale Sur les Maladies Des Plantes, Bordeaux, France. Paris, France: Association Nationale de Protection des Plantes, 1179-1185.
- Quagliaro, G., Vischi, M., Tyrka, M., and Olivieri, A.M. 2001. Identification of wild and cultivated sunflower for breeding purposes by AFLP markers. J. Hered. 92: 38-42.
- Rachid Al-Chaarani, G., Roustae, A., Gentzbittel, L., Mokrani, L., Barrault, G., Dechamps-Guillaume, G., and Sarrafi, A., 2002. A QTL analysis of sunflower partial resistance to downy mildew (*Plasmopara halstedii*) and black stem (*Phoma macdonaldii*) by the use of recombinant inbred lines (RILs). Theor. Appl. Genet. 104: 490-496.
- Rachid Al-Chaarani, G., Gentzbittel, L., Huang, X., and Sarrafi, A. 2004. Genotypic variation and identification of QTLs for agronomic traits using AFLP and SSR in recombinant inbred lines of sunflower (*Helianthus annuus* L.). Theor. Appl. Genet. 109: 1353-1360.
- Robles, P., and Micol, J.L. 2001. Isolation and characterization of fast-neutron induced mutants with abnormal leaf morphology in *Arabidopsis thaliana*. Int. J. Dev. Biol. 45: 59-60.
- Roustae, A., Barrault, G., Dechamps-Guillaume, G., Lesigne, P., and Sarrafi, A. 2000a. Inheritance of partial resistance to black stem (*Phoma macdonaldii*) in sunflower. Plant Pathol. 49: 396-401.

- Roustae, A., Costes, D., Dechamp-Guillaume, G., and Barrault, G. 2000b. Phenotypic variability of *Leptosphaeria lindquistii* (*Phoma macdonaldii*) a fungal pathogen of sunflower. *Plant Pathol.* 49: 227–234.
- Roy, J.K., Bandopadhyay, R., Rustgi, S., Balyan, H.S., and Gupta, P.K. 2006. Association analysis of agronomically important traits using SSR, SAMPL and AFLP markers in bread wheat. *Curr. Sci.* 90: 683-689.
- Sarrafi, A., Kayyal, H., Rachid Al-Chaarani, G., Cantin, F., Chaline, A.S. and Durielle, A.S. 2000. Inheritance of organogenesis parameters in cotyledons of sunflower (*Heliantus annuus* L). *J. Genet. Breed.* 54: 227-231
- Skorda, E.A. 1977. Stem and stripe rust resistance in wheat induced by gamma rays and thermal neutrons. *In: Induced mutation against plant disease*, IAEA, Vienna. pp. 385-392.
- Vijayan, K., Srivatsava, P.P., Nair, C.V., Awasthi, A.K., Tikader, A., Sreenivasa, B., and Urs, S.R. 2006. Molecular characterization and identification of markers associated with yield traits in mulberry using ISSR markers. *Plant Breed.* 125: 298-301.
- Virk, P.S., Ford-Lloyd, B.V., Jackson, M.T., Pooni, H.S., Clemeno, T.P., and Newbury, H.J. 1996. Predicting quantitative variation within rice germplasm using molecular markers. *Heredity* 76: 296-304.
- Warner, J.N. 1952. A method for estimating heritability. *Agron. J.* 44: 427-430.
- Zhang, M.X., Xu, J.L., Luo, R.T., Shi, D., and Li, Z.K. 2003. Genetic analysis and breeding use of blast resistance in a japonica rice mutant R917. *Euphytica* 130: 71-76.

Table 1. AFLP primer combinations and their polymorphic markers used for genotyping M6 mutant lines of sunflower

Primer combinations	Number of polymorphic markers	Primer combinations	Number of polymorphic markers
E31M50 (E _{AAA} ×M _{CAT})	13	E33M48 (E _{AAG} ×M _{CAC})	9
E31M62 (E _{AAA} ×M _{CTT})	10	E33M59 (E _{AAG} ×M _{CTA})	15
E31M48 (E _{AAA} ×M _{CAC})	9	E37M50 (E _{ACG} ×M _{CAT})	27
E33M50 (E _{AAG} ×M _{CAT})	16	E37M48 (E _{ACG} ×M _{CAC})	8
E33M60 (E _{AAG} ×M _{CTC})	11	E37M62 (E _{ACG} ×M _{CTT})	9
E33M61 (E _{AAG} ×M _{CTG})	8	E38M62 (E _{ACT} ×M _{CTT})	8
E33M47 (E _{AAG} ×M _{CAA})	13	E40E50 (E _{AGC} ×M _{CAT})	9
E33M49 (E _{AAG} ×M _{CAG})	15	E40M59 (E _{AGC} ×M _{CTA})	9
E33M62 (E _{AAG} ×M _{CTT})	10	Total	200

Table 2. Mean disease severity score of parents and offsprings and estimates of gene effects for partial resistance to Phoma black stem in sunflower

\bar{X}		Gene effect		Variance components	
Parents and offsprings		Parameters	Estimate	Parameters	Estimate
M6-54-1 (P ₁)	2.4 ^d	m	4.81 ^{**}	S^2_A	1.99
ENSAT-B4 (P ₂)	7.4 ^a	[a]	-0.44 ^{ns}	S^2_D	2.03
F ₁	6.2 ^b	[d]	7.17 ^{**}	S^2_E	2.36
F ₂	4.8 ^c	[aa]	5.84 ^{**}		
BC ₁ - P ₁ × (P ₁ × P ₂)	6.1 ^b	[ad]	-2.94 ^{**}	H	0.63
BC ₂ - P ₂ × (P ₁ × P ₂)	6.5 ^{ab}	[dd]	-8.68 [*]	h^2	0.31

\bar{X} = Mean of disease susceptibility (1-9); means followed by the same letters are not significantly different ($P=0.05$) according to Student-Newman-Keuls (SNK) test.

[m] = overall mean; [a] = pooled additive effects; [d] = pooled dominant effect; [aa] = pooled additive × additive effect; [ad] = pooled additive × dominant effect; and [dd] = pooled dominant × dominant epistatic effect.

S^2_A = additive variance; S^2_D = dominance variance; S^2_E = environmental variance;

H = broad-sense heritability calculated as follows: $H = (S^2_{F2} - S^2_E) / S^2_{F2}$

h^2 = narrow-sense heritability calculated as follows: $h^2 = S^2_A / S^2_{F2}$

^{*}, ^{**} and n.s. Significantly different from zero at the 0.05 and 0.01 and non-significant at the 0.05 probability level, respectively.

Table 3. Markers associated with partial resistance to Phoma black stem in sunflower mutant lines revealed by stepwise multiple regression analysis.

Markers	R^2	F	P -value
E33M61-8	0.1632	11.51	0.0012
E33M48-5	0.0934	7.29	0.0091
E33M60-6	0.0939	8.24	0.0057
E33M62-7	0.0697	6.74	0.0120
E38M62-7	0.0565	5.94	0.0180
E33M49-15	0.0952	12.00	0.0010
E31M50-5	0.0360	4.87	0.0317
E31M50-6	0.0356	5.20	0.0268
Total	0.6436		

R^2 : Percentage of phenotypic variation explained by each marker

Table 4. Sunflower mutant lines with their observed and predicted susceptibility values to Phoma black stem (1-9) and their AFLP markers associated to partial resistance.

Genotype	DSS ^a		Confidence Interval		Marker (M) ^d							
	Observed ^b	Predicted ^c	Lower	Upper	1	2	3	4	5	6	7	8
AS613	7.19	6.77	5.38	8.17	+	+	+	+	+	-	+	+
M6-214 -1	7.94	6.88	5.39	8.36	-	+	-	-	-	+	-	+
M6-85 -3	7.66	7.71	6.28	9.13	+	+	+	-	-	+	-	-
M6-696 -1 -1	7.54	7.02	5.59	8.46	-	+	+	-	+	-	+	+
M6-85 -2	7.5	6.80	5.35	8.25	-	+	+	-	-	-	-	+
M6-284 -1	7.5	7.04	5.60	8.48	+	+	+	-	-	-	+	-
M6-653 -1	7.4	6.98	5.55	8.40	+	-	+	-	+	-	+	+
M6-38 -1	7.37	6.78	5.37	8.19	+	-	+	-	+	-	-	-
M6-36 -2	7.24	7.49	6.09	8.89	+	+	+	-	+	-	+	+
M6-66 -1	7.23	6.55	5.10	8.00	+	+	+	+	+	-	-	-
M6-39 -2 -1	7.19	6.19	4.75	7.62	+	+	-	+	+	-	+	+
M6-676 -1 -1	7.13	6.70	5.25	8.15	-	-	+	-	+	+	+	+
M6-16 -2	7.12	7.19	5.76	8.63	-	+	+	+	-	+	-	+
M6-135 -2	7.07	6.78	5.36	8.20	-	+	+	+	+	-	-	+
M6-281 -1	7.01	6.96	5.53	8.40	-	+	+	-	-	+	+	+
M6-375 -1	6.98	6.22	4.78	7.67	+	-	+	+	-	+	+	+
M6-417 -1	6.93	7.49	6.09	8.89	+	+	+	-	+	-	+	+
M6-901 -2	6.92	7.07	5.65	8.48	+	+	+	-	-	-	-	-
M6-641 -2 -1	6.88	6.47	5.02	7.93	+	-	+	+	-	+	-	-
M6-338 -2 -2	6.86	7.39	5.91	8.88	-	+	+	+	+	+	+	+
M6-186 -1	6.77	6.20	4.74	7.67	+	+	-	-	+	-	+	-
M6-286 -1	6.69	6.74	5.33	8.15	+	+	+	+	-	+	+	+
M6-133 -2	6.64	7.21	5.76	8.67	+	+	+	+	-	+	-	+
M6-381 -1 -1	6.62	7.02	5.55	8.50	+	+	+	+	-	-	+	+
M6-691 -1	6.61	6.68	5.22	8.13	-	-	+	-	+	+	+	+
M6-582 -2	6.58	6.82	5.40	8.25	-	+	+	-	-	-	-	+
M6-99 -2	6.45	6.99	5.56	8.41	+	+	+	+	-	+	-	-
M6-284 -2	6.43	5.99	4.52	7.45	-	-	+	+	+	+	-	+
M6-792 -2	6.43	5.84	4.42	7.25	-	-	+	-	+	-	-	-
M6-32 -1 -1	6.43	6.29	4.82	7.75	+	-	+	+	+	-	+	+
M6-771 -1	6.42	6.55	5.15	7.96	-	+	+	-	+	-	+	+
M6-143 -2	6.32	6.27	4.82	7.71	+	-	+	-	-	+	+	-
M6-575 -1	6.26	6.35	4.92	7.78	-	+	+	-	-	-	-	+
M6-32 -2	6.26	6.98	5.55	8.42	-	-	+	-	+	-	-	+
M6-133 -1	6.24	7.54	6.06	9.03	+	+	-	-	+	+	+	+
M6-696 -1 -2	6.24	6.31	4.89	7.73	-	+	+	+	+	-	-	+
M6-378 -1	6.22	5.87	4.44	7.31	+	+	+	+	-	-	+	-
M6-826 -2 -1	6.19	5.94	4.48	7.41	-	+	-	+	+	-	-	-
M6-826 -2 -2	6.15	5.68	4.21	7.15	-	-	-	+	+	-	-	+
M6-46 -1	6.09	6.27	4.84	7.70	-	+	+	+	-	+	+	+
M6-52 -1 -1	6.05	6.04	4.57	7.50	+	-	+	+	+	-	-	-
M6-886 -3	6.04	6.29	4.84	7.74	-	+	+	-	-	+	+	-
M6-844 -1	6.03	7.23	5.8	8.65	+	-	+	-	+	-	-	-
M6-495 -1	5.96	5.83	4.43	7.24	-	+	+	+	+	-	+	+
M6-531 -2	5.89	5.63	4.17	7.08	-	+	+	-	-	-	+	-
M6-652 -1	5.87	5.36	3.94	6.78	-	-	+	-	-	-	+	+

Table 4: continued

Genotype	DSS		Confidence Interval		Marker (M)							
	Observed	Predicted	Lower	Upper	1	2	3	4	5	6	7	8
M6-509 -1	5.86	4.91	3.49	6.33	-	-	+	-	-	-	+	+
M6-54 -1A	5.86	5.12	3.69	6.56	-	-	+	+	+	-	-	-
M6-53 -2	5.80	5.61	4.20	7.02	-	+	+	+	-	-	+	+
M6-485 -2	5.80	6.53	5.12	7.94	+	-	+	-	+	-	+	+
M6-263 -2	5.54	5.99	4.53	7.44	-	+	-	-	-	-	-	-
M6-78 -1	5.46	5.02	3.59	6.45	-	+	-	+	-	-	+	+
M6-225 -2	5.45	4.97	3.50	6.43	-	-	-	-	-	+	+	+
M6-435 -2	5.07	5.16	3.74	6.59	-	-	+	-	-	-	-	-
M6-357 -1	4.80	6.13	4.72	7.53	-	+	+	-	-	-	-	-
M6-352 -2 -2	4.67	5.16	3.76	6.56	-	+	+	+	-	-	+	+
M6-502 -2 -2	4.39	3.87	2.41	5.33	-	+	-	+	-	-	+	-
M6-796 -2	4.21	4.76	3.32	6.20	-	-	-	+	+	-	-	+
M6-39 -2 -2	3.03	4.20	2.77	5.63	-	-	+	+	-	-	+	+
M6-862 -1	2.61	4.03	2.56	5.51	-	-	-	+	+	-	+	-
M6-54 -1	2.60	3.61	2.15	5.07	-	-	-	+	-	-	+	+

AS613: Original line

^a DSS: disease severity score, scale ranging from 1 (resistance) to 9 (susceptibility).

^b Observed values; mean of host reaction in 3 replications, each containing 24 cotyledon petioles.

^c Predicted values; the mean of host reaction upon their marker profiles.

^d M1: E33M61-8, M2: E33M48-5, M3: E33M60-6, M4: E33M62-7, M5: E38M62-7, M6: E33M49-15, M7: E31M50-5, M8: E31M50-6

‘+’ and ‘-’ presence and absence of a marker, respectively

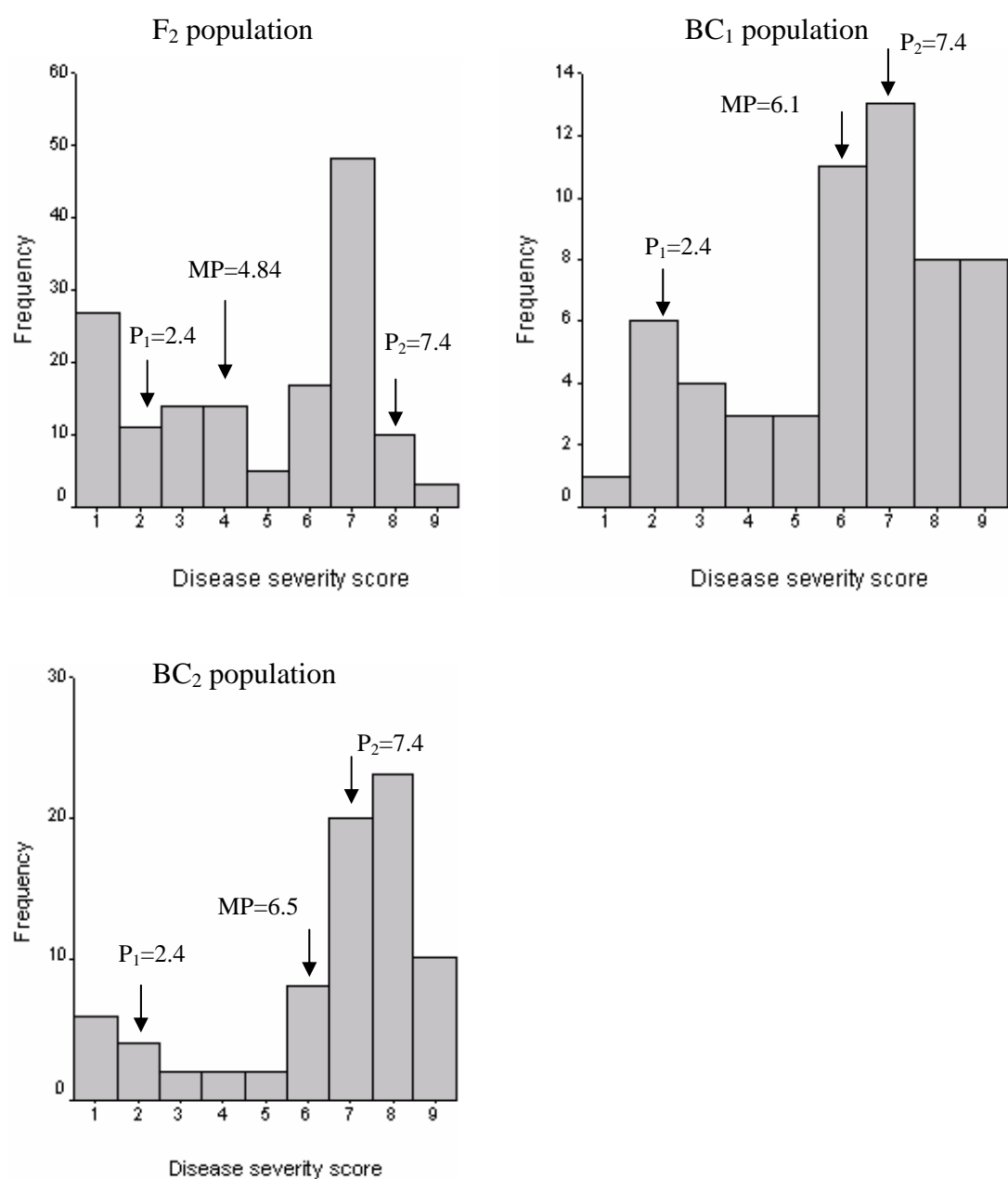


Fig. 1. Frequency distribution for Phoma black stem partial resistance in different generations of the cross between ‘M6-54-1’, partial resistant mutant and ‘ENSAT-B4’; a susceptible line. Arrows show disease severity score of parental lines (P₁= ‘M6-54-1’ and P₂= ‘ENSAT-B4’) and mean of each population (MP) to *P. macdonaldii*.

Resultats et Discussion

Au cours de notre étude d'interaction 'génotype-isolat', nous avons identifié le mutant M6-54-1 qui a montré une résistance partielle aux isolats du Phoma (Darvishzadeh et al., 2007a). Dans notre programme diallèle la valeur de l'aptitude générale à la combinaison a montré la capacité de cette lignée à transmettre sa résistance à des isolats MP10 et MA6 dans leurs descendances par hybridation avec d'autres génotypes. Afin de rechercher des marqueurs de résistance qui mettent à disposition des sélectionneurs des outils puissants d'aide à la sélection, nous avons développé une carte de liaison en utilisant 100 individus F2 issues du croisement entre M6-54-1 et ENSAT-B4. L'étude de la variabilité génétique, ainsi que la recherche de QTLs contrôlant la résistance partielle aux isolats du Phoma (MA6, MP6 et MP10), ont été basées sur les données phénotypiques concernant la sensibilité des familles F3 aux isolats testés.

Les analyses de variance ont montré un effet fortement significatif du génotype pour la résistance aux isolats du Phoma. Le génotype M6-54-1 a révélé une différence significative pour la résistance partielle aux isolats du Phoma, par comparaison avec le témoin qui est le parent ENSAT-B4. La distribution de la fréquence des familles F3 et leurs parents pour la résistance partielle aux isolats étudiés a montré des modèles continus, suggérant que la résistance partielle puisse être contrôlée par un système polygénique. La ségrégation observée montre des individus transgressifs dans les trois isolats testés. Lorsque les allèles augmentant ou diminuant le caractère quantitatif sont dispersés dans les lignées parentales, l'accumulation d'allèles favorables dans la descendance peut générer des lignées plus performantes que les parents. La ségrégation transgressive a déjà été décrite par Rachid Al-Chaarani et al. (2002) et Bert et al. (2004) dans le cas de la résistance partielle du tournesol au Phoma. L'héritabilité au sens large pour la résistance partielle à différents isolats du Phoma est comprise entre 0.46 et 0.71, valeur proche de celle trouvée par Roustaei et al. (2000a) et Abou Al Fadil et al. (2004).

Bert et al. (2004), ont rapporté une héritabilité au sens large de 0.94 pour la résistance partielle du tournesol à *P. macdonaldii*.

La carte génétique est constituée de 130 marqueurs et de 17 groupes de liaison (LG) de longueurs différentes variant entre 27 et 199.2 cM et comportant entre 2 et 19 marqueurs par groupe. Elle s'étend sur 1490 cM avec une densité moyenne d'un marqueur tous les 12.4 cM. Des 17 groupes de liaisons, 12 ont pu être associés à des groupes de liaisons déjà définis (Tang et al., 2002; Poormohammad Kiani et al., 2007) par la localisation des marqueurs SSR. Pour ces 12 groupes, nous avons employé la numérotation de Tang et al. (2002) et Poormohammad Kiani et al., (2007), les autres 5 groupes ont été nommés par les lettres A à E. En combinant les résultats des trois isolats testés, dix-sept régions génomiques contenant QTLs associé à la résistance partielle au Phoma ont été identifiées. Les variances phénotypiques dues à l'effet des QTLs sont comprises entre 4% et 41% pour les isolats étudiés. Parmi les dix-sept régions génomiques détectées, trois QTLs (*bsrMA6.8.1*, *bsrMP6.8.1* et *bsrMP10.8.2*) co-localisent sur le groupe de liaison 8. Ces QTLs sont très importants puisqu'ils expliquent 18, 34 et 42% de la variance phénotypique pour la résistance partielle aux isolats MP10, MA6 et MP6, respectivement. Pour ces QTLs, les effets dominants sont plus importants que ceux additifs et les allèles ayant des effets positifs pour la résistance partielle proviennent de ENSAT-B4. D'autres co-localisation de QTLs ont également été observées pour la résistance aux isolats MA6 et MP10, sur les groupes de liaison 5 (*bsrMA6.5.1* et *bsrMP10.5.2*) et 9 (*bsrMA6.9.1* et *bsrMP10.9.1*) ainsi que pour isolats MP6 et MP10 sur le groupe de liaison 1 (*bsrMP6.1.1* et *bsrMP10.1.1*). La co-localisation de QTLs indiquent l'implication de la même région génomique dans la résistance à différent isolats du Phoma. Le terme QTL non spécifique fait référence à des QTLs qui pourraient être importants dans les mécanismes généraux de défense vis-à-vis des isolats du Phoma. Certains QTLs sont spécifiques car ils interviennent dans les mécanismes de défense

vis-à-vis de certains isolats. Les exemples de QTLs spécifiques sont *bsrMA6.10.1* et *bsrMA6.10.2* pour l'isolat MA6, *bsrMP6.5.1* pour l'isolat MP6 ainsi que *bsrMP10.5.1* et *bsrMP10.8.1* pour l'isolat MP10. Ces QTLs pourraient être intéressants dans les programmes de sélection, permettant la résistance à un isolat donné, ou également pour accumuler les allèles favorables pour différents isolats au sein d'un seul et même génotype. L'accumulation des QTLs « isolat-non spécifique » avec celui « isolat-spécifique » pourraient augmenter à la fois le niveau de la résistance à un ensemble d'isolats et la probabilité de la durabilité de cette résistance.

Une étude génétique a également été réalisée en utilisant la carte récemment enrichie du laboratoire (Poormohammad Kiani et al., 2007) pour la recherche de marqueurs de résistance aux isolats MP8 et MP10. Les lignées parentales de cette carte (PAC2 et RHA266) ont présente des sensibilités opposées dans l'étude d'interaction isolat-génotype face à ces deux isolats (Darvishzadeh et al., 2007a). Les LR's utilisées dans notre étude d'identification des QTLs contrôlant la résistance partielle aux isolats de *P. macdonaldii*, ont présenté une importante variation génétique pour la résistance partielle à la maladie. PAC2 possède la résistance à l'isolat MP8, mais la sensibilité à l'isolat MP10, tandis que RHA266 montre une résistance à l'isolat MP10, et une sensibilité à l'isolat MP8, ce qui confirme nos résultats ultérieurs (Darvishzadeh et al., 2007a). La différence entre les lignées recombinantes et la moyenne de leurs deux parents n'est pas significative pour les deux isolats étudiés, ce qui indique que les lignées recombinantes utilisées sont représentatives de la population obtenue après hybridation entre les deux génotypes parentaux. Pour ce qui concerne la distribution de fréquence des LR's et de leurs parents pour la résistance partielle aux isolats étudiés, le gain génétique chez les 10% de lignées recombinantes sélectionnées et l'héritabilité pour la résistance partielle aux isolats MP8 et MP10, les résultats sont en accord avec ceux de notre carte précédente (Darvishzadeh et al., 2000a). 10 QTLs ont été détectés pour la résistance

partielle aux isolats MP8 et MP10. La comparaison des positions des QTLs impliqués dans la résistance aux isolats du Phoma étudiés a montré une co-localisation de deux QTLs contribuant à la résistance partielle à l'isolat MP8 avec ceux de l'isolat MP10, sur les groupes de liaison 5 et 15. Les allèles ayant des effets positifs pour la résistance partielle aux QTLs co-localisés sur le groupe de liaison 5 proviennent de RHA266 alors que dans le cas des QTLs co-localisés sur le groupe de liaison 15, les allèles positifs proviennent de PAC2. Les allèles ayant un effet favorable pour les QTLs viennent des deux lignées parentales. Ceci est en accord avec la ségrégation transgressive observée chez la population RILs ainsi que chez la population F2.

Recherche des marqueurs moléculaires de la résistance partielle en utilisant une population de mutants

Huit marqueurs AFLP liés à la résistance partielle au Phoma ont été identifiés. Les effets cumulatifs des 8 marqueurs (R^2) ont expliqué 64.36% de la variation phénotypique. Trois marqueurs, 'E33M61_8', 'E33M48_5', 'E33M60_6' ont expliqué une part importante de la variation de sensibilité à la maladie des taches noires. La prévision de la performance de tous les mutants pour la sensibilité à la maladie, basée sur leurs profils de marqueurs, a démontré qu'aucun d'entre eux ne montre une différence significative par rapport aux valeurs observées. Des études d'association ont été employées chez plusieurs espèces afin d'identifier des marqueurs moléculaires liés aux différents caractères. Virk et al. (1996) ont identifié l'association entre les caractères phénotypiques et les marqueurs RAPD chez le riz. Des marqueurs ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) liés aux composants du rendement ont été découverts chez le mûrier par Vijayan et al. (2006). Les marqueurs AFLP associés à la résistance partielle à la maladie des taches noires, peut fournir des informations intéressantes pour la sélection assistée par marqueurs. Cependant, les marqueurs identifiés dans la présente étude doivent être validés.

**CHAPITRE V: ETUDE DE L'EXPRESSION DES GENES IMPLIQUES
DANS LA RESISTANCE DU TOURNESOL AU PHOMA**

Introduction

Après avoir étudié l'interaction isolat-génotype et l'existence d'une « isolat-spécificité » de la résistance partielle au Phoma, nous nous sommes intéressés à étudier à l'expression des gènes impliqués dans le mécanisme de défense dans le cas d'interaction compatible et partiellement compatible du pathosystème Phoma -Tournesol.

Les plantes se défendent contre des attaques d'agents pathogènes par différents mécanismes. Pendant la réponse de défense des plantes, la restriction de la diffusion de l'agent pathogène est mise en œuvre par l'intermédiaire de l'induction et de la répression d'un groupe de gènes notés comme gènes associés à la défense. Pendant la phase d'interactions entre plante et champignon, habituellement les différences entre les interactions compatibles et incompatibles ne sont pas évidentes (Boyd et al., 1995; Hardham, 2001; Tucker & Talbot 2001; Caldo et al., 2004). Récemment, on a constaté que l'accumulation d'ARNm dans des interactions compatibles et incompatibles du pathosystème oïdium-orge était la même jusqu'à 16 h, mais variait ensuite (Caldo et al., 2004). L'arrivée de la technologie microarray a permis l'analyse à grande échelle des profils d'expression de gènes dans différents types d'interactions plante-agent pathogène (Maleck et al., 2000; Schenk et al., 2000; Scheideler et al., 2002; Hui et al., 2003; Dowd et al., 2004; Marathe et al., 2004). Ce type d'analyse peut nous permettre d'identifier des gènes ou des familles de gènes intervenant dans la résistance à des maladies chez des espèces différentes.

Les études d'expression de gènes sont importantes non seulement pour établir des similitudes et des différences dans la réponse entre les interactions compatibles et incompatibles, mais également pour mieux comprendre le mécanisme par lequel la plante répond aux différents isolats d'agent pathogène. D'ailleurs, la RT-PCR quantitative est actuellement la technique disponibles la plus sensible pour la détection et la quantification d'ARNm (Heid et al., 1996; Livak & Schmittgen, 2001).

Alignan et al. (2006) grâce à la mise au point d'une puce à ADN composée de 1000 unigènes, dont plus de 100 gènes impliqués dans la résistance des plantes aux maladies, ont pu mettre en évidence l'expression différentielle de certains gènes en comparant un génotype partiellement résistant et un génotype sensible, en réponse à l'infection par un isolat de *P. macdonaldii*. Au vu des résultats obtenus, ils ont démontré que : (1) la régulation négative d'une MAPK phosphatase à double spécificité pourrait être impliquée dans les mécanismes de défense du tournesol en réponse à *P. macdonaldii*, (2) l'activation d'une cascade MAP kinase pourrait impliquer des réponses de défense (biosynthèse de thaumatine, activation de la PAL pouvant engendrer la synthèse de phytoalexines), sous le contrôle de facteurs de transcription appartenant aux familles MYB et WRKY, (3) parallèlement, l'activation d'une protéine phosphatase 2A, impliquée dans l'inhibition de la mort cellulaire, pourrait limiter le développement de l'agent pathogène.

Les objectifs de notre étude étaient d'étudier les variations concernant le niveau d'expression des gènes décrits ci-dessus chez deux lignées de tournesol inoculées par trois isolats de ce pathogène, dans des conditions contrôlées, en utilisant la RT-PCR quantitative. Nous avons donc travaillé avec deux lignées de sensibilités opposées aux isolats de *P. macdonaldii*. Il s'agit du mutant M6-54-1, résistant à l'isolat MA6 et sensible à l'isolat MP8, et de sa lignée d'origine AS613 résistante à l'isolat MP8 mais sensible à l'isolat MA6. Les résultats de cette expérimentation sont présentés dans l'article N° 6, soumis pour publication dans 'Crop Protection'.

Differential expression of defence-related genes between compatible and partial compatible sunflower-*Phoma macdonaldii* interactions

R. Darvishzadeh¹, T. Hewezi^{1,2}, L. Gentzbittel¹, A. Sarrafi¹

¹ *Department of Biotechnology and Plant breeding, BAP-ENSAT, 18 Chemin de Borde Rouge, BP-32607, 31326 Castanet, France*

² *Department of Plant Pathology, Iowa State University, USA*

Darvishzadeh et al. (2007e). Crop Protection (Soumis)

Corresponding author: Professor Ahmad Sarrafi

Department of Biotechnology and Plant breeding, BAP-ENSAT, 18 Chemin de Borde Rouge, BP-32607, 31326 Castanet, France

E-mail: Sarrafi@ensat.fr

Phone: +33 5 62193580

Fax: +33 5 62193581

Abstract

A population of 120 mutant lines (M6), developed by seed irradiation with gamma rays, and their original line ('AS-613') was evaluated with an aggressive French isolate of *Phoma macdonaldii* ('MP6'). Four mutant lines as well as the original line were chosen and their reactions, evaluated against seven *P. macdonaldii* isolates. Contrast interactions in the response of original line 'AS613' and its mutant line 'M6-54-1' versus two Phoma black stem isolates 'MA6' and 'MP8' were observed. The mutant line showed also partial resistance to 'MP10' isolate. These six line/isolate combinations were used to assess the profile of 12 genes potentially associated with the partial resistance of sunflower to *P. macdonaldii* using quantitative real-time RT-PCR. Five genes out of 12 showing changes in gene expression as small as 2.0-folds were excluded from statistical analysis. The expression of three genes out of seven was found to be up regulated by infection. Genes encoding phenylalanine ammonia-lyase 2 (2PAL) and thaumatin-like protein showed significant differences in expression between partial compatible and compatible interactions of original line and its mutant challenged by 'MP8' and 'MA6' isolates, so that the degree of induction was higher in the partial compatible interaction than the compatible ones. No significant difference in gene expression level of the above mentioned genes was observed between original line and its mutant contaminated by 'MP10' isolate. The expression of 4 genes out of 7 was down regulated in both lines across three isolates. A straightforward correlation between expression levels of genes encoding HD-Zip transcription factor and protein phosphatase and disease symptom was observed in original line and its mutant challenged by 'MA6' isolate so that the degree of repression was higher in the partial compatible interaction than the compatible ones. This suggests an active inhibition of host genes upon pathogen infection.

Keywords: *Helianthus annuus* L.; gamma ray; mutation; partial resistance; *Phoma macdonaldii*; plant defense; quantitative real-time RT-PCR

1. Introduction

Phoma black stem caused by *Phoma macdonaldii* is one of the most important diseases of sunflower in France (Debaeke and Pérès, 2003). The disease is mainly characterized by black spots that appear on the stem at the base of leaf petioles and spread along stems. When Phoma girdles the stem base, symptoms of premature ripening may occur (Donald et al., 1987; Sackston, 1992) resulting in small heads and seeds that are empty or not completely filled, reducing seed and oil yields (Carson, 1991). To date no genotypes have been identified to be completely resistant but some lines are more resistant than others. The inheritance of sunflower resistance to Phoma black stem was reported to be quantitative under additive and dominant effects (Roustae et al., 2000a). In two independent studies, several QTLs for partial resistance were identified indicating the polygenic nature of resistance to Phoma black stem (Rachid Al-Chaarani et al., 2002; Bert et al., 2004). It has been recognized that significant differences in pathogenicity exist among different *P. macdonaldii* isolates on the same genetic material (Roustae et al., 2000b).

As Konzak et al. (1977) have pointed out, induced mutation is considered as a supplement to natural genetic variability. Intensive work has been done on the induction of mutations by using irradiation, chemicals and other mutagenic agents in different species. Gamma rays have been employed to develop 64% of the radiation-induced mutants, followed by X-ray (22%) (Maluszynski et al., 2000). Radiation mutagenesis causes various chromosomal DNA alterations in plant, such as deletions, point mutations and inversions. Mutants showing increased resistance to fungal pathogens have been isolated in some crops including blast resistance in rice (Han et al., 2004) and *Ascochyta* blight and *Fusarium* wilt resistance in chickpea (Ahloowalia et al., 2004).

Alignan et al. (2006) using 1000-element cDNA nylon microarray have investigated transcriptional changes that occur during the activation of multigenic resistance in partially

resistant and susceptible sunflower lines inoculated with *P. macdonaldii* isolate 'MP6'. 12 cDNA clones were identified in the above-mentioned study. Two of them putatively encoded PAL2 and thaumatin-like protein as known defense-related proteins and other ones encoded regulatory proteins and transcription factors that play important roles in disease signaling by controlling the transcriptional activity of defense-related genes. Reverse-transcription (RT) combined to real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) is the most sensitive technique for mRNA detection and quantitation currently available (Heid et al., 1996; Livak and Schmittgen, 2001).

The objectives of this study were to determine the genetic variation of sunflower mutant lines and their original line for partial resistance to Phoma black stem isolates and to investigate the relative changes in gene expression level of the above described genes in sunflower lines using real-time quantitative RT-PCR assay following *P. macdonaldii* challenge.

2. Materials and methods

2.1. Seedling resistance experiments

The sunflower pure line 'AS613' has been produced in our department from a cross between two genotypes ('ENSAT-125' and 'ENSAT-704') through a single seed descent (SSD) programme (Sarrafî et al., 2000). 1500 seeds of this genotype were exposed to gamma radiation at the Atomic Energy Center (Cadarache, France), with a dose of 75 Grays. The M2 to M6 generations were advanced by modified SSD method. From 2000 M6 mutant lines, a population of 120 mutants presenting morphological differences with the original line 'AS613' were chosen for this study. The experimental design was a completely randomized block with three replications. Seeds were sterilized for 5 min in a sodium hypochlorite solution (6 chlorometric degrees) and washed in sterile distilled water. Two rows of six seeds per genotype per replication were sown in plastic containers filled with horticulture substrate (Hawita Flor, Germany; <http://www.hawita-gruppe.de/>) and transferred to growth chamber

(Hawita Flor, Germany; <http://www.hawita-gruppe.de/>) and transferred to growth chamber [14h photoperiod and $25 \pm 1^\circ\text{C}/18 \pm 1^\circ\text{C}$ light / dark temperature with a light intensity of $200 \mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$ provided by NAV-T 600W lamps Osram-Vialox, Molsheim, France under 75-80% relative humidity]. The response of mutant lines was evaluated with an aggressive French isolate of *P. macdonaldii* (MP6) (Roustae et al., 2000b). MP6 isolate was grown on Potato Dextrose Agar medium at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ in 12h photoperiodism ($37 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). After a ten-day incubation period, pycniospore suspension was obtained by addition of sterile water at the surface of the culture and mechanical mixing. Twenty microliters of spore suspension containing 10^6 pycniospores/mL in water, 0.5% orange juice and 0.25% gelatine were deposited at the intersection of cotyledon petiole and hypocotyl of two-leaf-stage sunflower plantlets. During the first 48h following inoculation, plantlets were covered with a transparent cover (Plexiglas) to maintain nearly saturated humidity, favorable for fungal development. Both cotyledon petioles of plantlets were scored seven days after inoculation according to the percentage of the petiole area exhibiting disease symptoms (necrosis). A score of 1 (resistance) to 9 (susceptible) was given in relation to the proportion of petiole area showing necrosis as proposed by Roustae et al. (2000a), where: 1= 0-5%, 2=6-10%, 3= 11-20%, 4=21-30%, 5=31-40%, 6=41-60%, 7=61-80%; 8=81-99% and 9=100%, with necrosis spreading down the stem. Several mutant lines were identified that consistently showed an altered black stem partial resistance and four of them 'M6-894-2, M6-133-2, M6-54-1, M6-85-3' presenting also important morphological differences were chosen for further investigations. The response of these four sunflower mutant lines and their original line 'AS613' were evaluated in the same way with seven isolates of *P. macdonaldii* named 'MP3', 'MA7', 'MP11', 'MP6', 'MP10', 'MP8' and 'MA6'. These isolates represent the maximum variability on the base of our previous studies (Roustae et al., 2000b). The experiment was conducted in split plot design (isolate as main-plot factor with 7 levels and genotype as sub-

plot factor with 5 levels) with three replications. Each replicate consisted of 12 plantlets from each genotype.

2.2. Molecular experiment

Results of the first experiment showed that the mutant line 'M6-54-1' and the original line 'AS613' present contrast responses to 'MA6' and 'MP8' isolates and both of them are partially resistant to 'MP10' isolate. These six line/isolate combinations were used to assess the profile of 12 genes potentially associated with the partial resistance of sunflower to *P. macdonaldii*, which were recently identified in our department (Alignan et al., 2006). Variation in transcript abundance of these selected genes was determined 48h after pathogen inoculation by comparing the mean mRNA expression in inoculated plants and in control treatment. The 48h time point was selected because differences between compatible and partially compatible interaction become morphologically apparent at this time. The experimental design and pathogen inoculation were the same as explained for seedling resistance experiments. The control treatments were inoculated by 20 µL of the same solution without spores. Three biological repeats were performed. For each, cotyledonary petioles collected from at least 15 plantlets were pooled on one sample prior to RNA preparation. Several inoculated plants of both original line and its mutant 'M6-54-1' were grown in the same conditions as described above, in order to control efficiency of inoculation.

2.3. RNA extraction and cDNA synthesis

Cotyledon petioles collected from treated as well as control plants, at 48h after inoculation, were used to extract total RNA as described by Verwoerd et al. (1989). Single-stranded cDNAs were synthesized from DNase-treated RNA using Advantage RT-for-PCR Kit (BD Biosciences). The reaction mixture containing 5 µg of total RNA and 40 pmol oligo (dT₁₅) was heated at 70°C for 10 min. Then, 8 µL of 5X reaction buffer, 2 µL of dNTP mix (0.625 mM each), 1 µL (1 Unit) of RNase inhibitor and 2 µL (400 Units) of MMLV reverse

transcriptase were added. The reaction was incubated at 42°C for 1h. An additional 200 Units of MMLV reverse transcriptase were added and the mixture was incubated for another 60 min at 42°C followed by heating at 70 °C for 15 min to stop the synthesis reaction.

2.4. Quantitative real-Time RT-PCR

Gene-specific primers were designed using the Primer Express Software, Version 2.0 (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Oligonucleotide primer sequences are shown in Table 1. The reaction was performed in 20 µl containing 10 µl 2X SYBR Green Mastermix (Applied Biosystems), 300 nM of each primer and 1 µl of 5 fold-diluted RT products. The PCR reactions were run in ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) using the following programme: 50°C for 2 min, 95°C for 10 min and 40 cycles of 95°C for 15 sec and 60°C for 1 min. Following PCR amplification, the reactions were subjected to temperature ramp to create the dissociation curve, measured as changes in fluorescence measurements as a function of temperature, by which the non-specific products can be detected. The dissociation programme was 95°C for 15 sec, 60°C for 15 sec followed by 20 min of slow ramp from 60°C to 95°C. Three biological replicates of each reaction were performed and *Actin*, as constitutively expressed gene, was used as an internal control for normalization. Quantifying the relative changes in gene expression was performed using $2^{-\Delta\Delta CT}$ method as described by Livak and Schmittgen (2001).

2.5. Statistical analysis

In first experiment, analysis of variance was performed using the general linear model (GLM) procedure in the SAS software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). The main effects of genotypes, isolates as well as their interactions were determined. The Student-Newman-Keuls test was used in MSTAT-C software (Bricker, 1989) for comparing means. As the gene expression data in molecular experiment deviated from normality, non-parametric

methodology of Brunner et al. (2002) described in detail by Shah and Madden (2004) was used for analysis.

3. Results

3.1. Mutant lines evaluation

To select sunflower genotypes displaying different patterns of compatibility with Phoma black stem isolates, four mutants (M6-894-2, M6-133-2, M6-54-1, M6-85-3) together with their original line 'AS613' were challenged by seven isolates of *P. macdonaldii* (MP3, MA7, MP11, MP6, MP10, MP8, MA6) as described in materials and methods. Analysis of variance revealed that both genotype and genotype-by-isolate interaction were highly significant (data not presented). As shown in Table 2, 'M6-894-2', 'M6-133-2' and 'M6-85-3' mutants were found to be susceptible to all isolates of Phoma black stem. Different responses of the original line 'AS613' and 'M6-54-1' mutant to some isolates of Phoma black stem were observed. 'AS613' was found to be susceptible to 'MA6' whereas 'M6-54-1' was partially resistant. In contrast, 'AS613' showed partial resistance to 'MP8' whereas 'M6-54-1' was susceptible to the isolate (Table 2). The mutant line 'M6-54-1' showed also significantly higher partial resistance to 'MP10' isolate compared with 'AS613'. Based on these results, the original genotype 'AS-613' and its mutant line 'M6-54-1' were further inoculated with the three above mentioned isolates (MA6, MP8 and MP10) in order to investigate the relationship between partial resistance to the disease and changes in gene expression level.

3.2. Gene expression assessment

In order to investigate the relationship between disease resistance and gene expression level, the expression level of 12 genes potentially regulated by Phoma infection which are identified in our department were quantified using quantitative-real time RT-PCR in 'AS613' and its mutant line 'M6-54-1' each inoculated or non-inoculated by 'MA6', 'MP8' and 'MP10' isolates of *P. macdonaldii*. Five genes showing changes in gene expression as small as 2.0-

folds were excluded from statistical analysis. After exclusion of genes showing significant genotype-isolate interaction effects, only one gene, putatively encoding choline-phosphate cytidylytransferase, was identified as showing genotype-specific expression pattern across all combinations (gene whose expression is affected only by genotype irrespective the isolates used) (Table 3). This gene showed the same pattern of gene expression in both lines across all isolates, but the expression level of it was greater in original line compared with its mutant line (Fig. 1). Two genes were identified whose expression levels are affected by genotype and Phoma isolates whereas ‘genotype-isolate’ interaction is not significant. These genes putatively encode two transcription factors belonging to AP2 and MYB families (Table 3). Gene encoding putatively AP2 domain transcription factor was induced in all 6 interactions, its expression was higher in mutant line inoculated with ‘MP10’ isolate followed by ‘M6-54-1’/‘MA6’ and ‘M6-54-1’/‘MP8’ combinations (Fig. 1). Conversely, gene encoding MYB-related transcription factor was repressed in all 6 sunflower ‘genotype-isolate’ interactions, but the degree of repression was most in mutant line inoculated by ‘MA6’ isolate followed by ‘M6-54-1’/‘MP10’ and ‘M6-54-1’/‘MP8’ combinations (Fig. 1). Genes encoding HD-Zip transcription factor, protein phosphatase-related, thaumatin-like protein and PAL2 showed significant ‘genotype-isolate’ interactions (genes whose expression differentiated between genotype as a function of isolate change (Table 3). The expression of these genes was differentiated in two lines as a function of isolate. Genotype-isolate interaction at gene expression level is important to understand the mechanisms of plant response to disease infection. Taken together, these results indicate that genetic background and isolate genotype as well as their interaction affect gene expression in sunflower plants.

It could be important to mention that the 7 investigated genes exhibited the same trend of expression in ‘AS613’ and its mutant line of which three genes were induced and four genes were repressed. This trend of similarities suggests that a part of difference between ‘AS613’

and 'M6-54-1' mutant, during compatible and incompatible interactions, is related to quantitative mRNA expression changes rather than qualitative changes (Fig. 1).

4. Discussion

In this study we have characterised a few mutant lines coming from irradiated seeds of 'AS613' genotype regarding to their response to *P. macdonaldii* the causal agent of black stem disease in sunflower. Mutants showing high levels of disease resistance could be used directly for sunflower improvement either by providing sources of resistance for disease breeding programmes or by correcting a fault in the parental line. Furthermore, the isolation of mutant lines with altered resistance opens up new avenues for both fundamental and applied research of plant-pathogen interactions. One of these mutants, 'M6-54-1' showed strongly enhanced partial resistance toward one of the fungal isolate (MA6) compared to the parental line 'AS613'. The same mutant also possessed enhanced susceptibility to fungal isolate (MP8) toward which, its original line (AS613) is partial resistant. The mutant line 'M6-54-1' showed also significantly higher partial resistance to 'MP10' isolate compared with 'AS613'. As a first step toward characterization of the mutant 'M6-54-1', we assessed the expression of a small number of genes that have been already described to be regulated during infection with *P. macdonaldii* in our department (Alignan et al., 2006). The mutant and the original line were inoculated with *P. macdonaldii* isolates 'MP10', 'MP8' and 'MA6', and variation in transcript abundance of the selected genes was determined. The expression profiles of the examined genes suggest that a part of the differences between genotype responses to Phoma infection can be attributed to quantitative differences in gene expression (Fig. 1). The expression profiles of two genes putatively encoding PAL2 and thaumatin-like protein showed significant difference between partial compatible and compatible interactions of original line 'AS613' and its mutant 'M6-54-1' challenged by 'MP8' and 'MA6' isolates, so that the degree of induction was higher in the partial compatible interaction than the

compatible ones (Fig. 1). No significant difference in gene expression level of these genes was observed between original line and its mutant ‘M6-54-1’ inoculated by ‘MP10’ isolate (Fig. 1). Phenotypically both lines showed partial resistance to this isolate (Table 2). The induction of these two defense-related genes (thaumatin-like protein and PAL2) under all investigated conditions, suggest a vital role of these proteins in basal defense mechanism. Our results confirm those of Alignan et al. (2006) who reported that the transcript levels of genes putatively encoding PAL2 and thaumatin-like protein was significantly increased 48h post inoculation with ‘MP6’ isolate of *P. macdonaldii*. Our results are also in accordance with those of Mazeyrat et al. (1999) reporting that the expression level of PAL2 was rapidly and strongly accumulated after infection of sunflower to *Plasmopara halstedii*, the causal agent of downy mildew, in incompatible interactions, but not in the compatible ones. Thaumatin-like proteins were found to be involved in either constitutive or induced resistance to fungal attack (Selitrennikoff, 2001). Although the precise mechanism of action of thaumatin-like protein is not completely understood, there are a number of interesting research work indicating a crucial role of these proteins in the mediation of plant disease resistance (Richardson et al., 1987; Wang et al., 1996; Coca et al., 2000; Falk et al., 1999). Detailed expression analysis of these two genes over different time points could be of interest to distinguish compatible from partial compatible interactions. The expression of two genes putatively encoding HD-Zip transcription factor and protein phosphatase was found to be repressed in all 6 sunflower genotype-isolate interactions. A straightforward correlation between expression levels and disease symptom was observed in original line ‘AS163’ and its mutant ‘M6-54-1’ challenged by ‘MA6’ isolate so that the degree of repression was most in the partial compatible interaction (‘M6-54-1’/‘MA6’) than the compatible ones (‘AS163’/‘MA6’) (Fig. 1). The negative correlation between the expression patterns of these signaling components and partial compatible interaction ‘M6-54-1’/‘MA6’ suggests that these genes may play a role in

partial resistance of mutant line to 'MA6' isolate of *P. macdonaldii* as a negative regulators of plant defense response. An *Arabidopsis* homeodomain transcription factor was recently found to be repressed in response to infection by necrotrophic fungi (Feys et al., 2001). No significant difference in gene expression level of these genes was observed between original line and its mutant 'M6-54-1' contaminated by 'MP8' and 'MP10' isolates (Fig. 1).

Down regulation of some studied genes, in sunflower 'genotype-isolate' combinations (Fig. 1), implies active inhibition of host genes upon pathogen infection. The level of inhibition, however vary from pair wise interaction to another. It is likely that the inhibition of host genes is an essential step toward an efficient pathogenesis (Caldo et al., 2004). However, in some cases, pathogen suppressors not only suppress plant defense responses but can also act as activators of defense signaling (Jirage et al., 1999; Chen et al., 2002; Jin and Martin, 2000). Another possible explication of the down regulation of these genes is that their expression could overlap with an efficient defense response. Further studies to determine the mechanism of inhibition of these genes could provide new insights in the differences between compatible and incompatible sunflower-Phoma interactions.

In conclusion, a part of partial resistance in partially compatible interactions (AS613/MP10, M6-54-1/MP10, AS613/MP8 and M6-54-1/MA6) may be associated with the expression of genes encoding PAL2 and thaumatin-like protein, which showed significantly different expression levels between compatible and partially compatible interactions in both sunflower lines contaminated with 'MP10', 'MP8' and 'MA6' Phoma isolates. Genes encoding HD-Zip transcription factor and protein phosphatase may be also implicated in the partial resistance of the mutant line to 'MA6' isolate.

References

Ahloowalia, B.S., Maluszynski, M., Nichterlein, K., 2004. Global impact of mutation-derived varieties. *Euphytica* 135, 187-204.

- Alignan, M., Hewezi, T., Petitprez, M., Dechamp-Guillaume, G., Gentzbittel, L., 2006. A cDNA microarray approach to decipher sunflower (*Helianthus annuus* L.) responses to the necrotrophic fungus *Phoma macdonaldii*. *New Phytologist* 170, 523-36.
- Bert, P.-F., Dechamp-Guillaume, G., Serre, F., Jouan, I., Tourvieille de Labrouhe, D., Nicolas, P., Vear, F., 2004. Comparative genetic analysis of quantitative traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.) 3. Characterisation of QTL involved in resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Phoma macdonaldii*. *Theoretical and Applied Genetics* 109, 865-74.
- Bricker, A.A., 1989. MSTAT-C user's guide. Michigan State University, MSTAT/Crop and Soil Sciences, A87 Plant and Soil Sciences, East Lansing, Michigan, USA.
- Brunner, E., Domhof, S., Langer, F., 2002. Nonparametric analysis of longitudinal data in factorial experiment. New York, USA: John Wiley and Sons Publishing Group.
- Caldo, R.A., Nettleton, D., Wise, R.P., 2004. Interaction-dependent gene expression in Mla-specified response to barley powdery mildew. *The Plant Cell* 16, 2514-28.
- Carson, M.L., 1991. Relationship between Phoma black stem severity and yield losses in hybrid sunflower. *Plant Disease* 75, 1150-3.
- Chen, W., Provart, N., Glazebrook, J., Katagiri, F., Chang, H.S., Eulgem, T., Mauch, F., Luan, S., Zou, G., Whitham, S.A., 2002. Expression profile matrix of Arabidopsis transcription factor genes implies their putative functions in response to environmental stresses. *The Plant Cell* 14, 559-74.
- Coca, M.A., Damsz, B., Yun, D.J., Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Narasimhan, M.L., 2000. Heterotrimeric G-proteins of a filamentous fungus regulate cell wall composition and susceptibility to a plant PR-5 protein. *The Plant Journal* 22, 61-9.

- Debaeke, P., Pérès, A., 2003. Influence of sunflower (*Helianthus annuus* L.) crop management on Phoma black stem (*Phoma macdonaldii* Boerema). *Crop Protection* 22, 741-52.
- Donald, P.A., Venette, J.R., Gulya, T.J., 1987. Relationship between *Phoma macdonaldii* and premature death of sunflower. *Plant Disease* 71, 466-8.
- Falk, A., Feys, B., Frost, L.N., Jones, J.D.G., Daniels, M.J., Parker, J.E., 1999. EDS1, An essential component of R gene-mediated disease resistance in *Arabidopsis* has homology to eukaryotic lipases. *Proceedings of the National Academy of Science of USA* 96, 3292-7.
- Feys, B.J., Moisan, L.J., Newman, M.A., Parker, J.E., 2001. Direct interaction between the *Arabidopsis* disease resistance signalling proteins, EDS1 and PAD4. *The EMBO Journal* 20, 5400-11.
- Han, C.U., Lee, C.H., Jang, K.S., Choi, G.J., Lim, H.K., Kim, J.C., Ahn, S.N., Choi, J.E., Cha, J.S., Kim, H.T., Cho, K.Y., Lee, S.W., 2004. Identification of rice genes induced in a rice blast-resistant mutant. *Molecules and Cells* 17, 462-8.
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., Williams, P.M., 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Research* 6, 986-94.
- Jin, H., Martin, C., 2000. Multifunctionality and diversity within the plant MYB-gene family. *Nucleic Acids Research* 28, 2004-11.
- Jirage, D., Tootle, T.L., Reuber, T.L., Frost, L.N., Feys, B.J., Parker, J.E., Ausubel, F.M., Glazebrook, J., 1999. *Arabidopsis thaliana* PAD4 encodes a lipase-like gene that is important for salicylic acid signalling. *Proceedings of the National Academy of Science of USA* 96, 13583-8.

- Konzak, C.F., Nilan, R.A., Kleinhofs, A., 1977. Artificial mutagenesis as an aid in overcoming genetic vulnerability of crop plants. In: Muhammed A, Aksel R, Borstel RC, (eds.). Genetic Diversity in Plants. New York and London: Plenum Press, 163-77.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25, 402-8.
- Maluszynski, M., Nichterlein, K., van Zanten, L., Ahloowalia, B.S., 2000. Officially released mutant varieties, the FAO/IAEA Database. *Mutation Breeding Review* 12, 1–84.
- Mazeyrat, F., Mouzeyar, S., Courbou, I., Badaoui, S., Roeckel-Drevet, P., Tourvieille de Labrouhe, D., Ledoigt, G., 1999. Accumulation of defence related transcripts in sunflower hypocotyls (*Helianthus annuus* L.) infected with *Plasmopara halstedii*. *European Journal of Plant Pathology* 105, 333-40.
- Rachid Al-Chaarani, G., Roustae, A., Gentzbittel, L., Mokrani, L., Barrault, G., Dechamp-Guillaume, G., Sarrafi, A., 2002. A QTL analysis of sunflower partial resistance to downy mildew (*Plasmopara halstedii*) and black stem (*Phoma macdonaldii*) by the use of recombinant inbred lines (RILs). *Theoretical and Applied Genetics* 104, 490-6.
- Richardson, M., Valdes-Rodriguez, S., Blanco-Labra, A., 1987. A possible function for thaumatin and a TMV-induced protein suggested by homology to a maize inhibitor. *Nature* 327, 432-4.
- Roustae, A., Barrault, G., Dechamp-Guillaume, G., Lesigne, P., Sarrafi, A., 2000a. Inheritance of partial resistance to black stem (*Phoma macdonaldii* Boerema L.) in sunflower. *Plant Pathology* 49, 396-401.
- Roustae, A., Costes, D., Dechamp-Guillaume, G., Barrault, G., 2000b. Phenotypic variability of *Leptosphaeria lindquistii* (*Phoma macdonaldii*) a fungal pathogen of sunflower. *Plant Pathology* 49, 227-34.

- Sackston, W.E., 1992. On a treadmill: breeding sunflower for resistance to disease, *Annual Review of Phytopathology* 30, 529-51.
- Sarrafi, A., Kayyal, H., Rachid Al-Chaarani, G., Cantin, F., Châline, A.S., Durielle, E., 2000. Inheritance of organogenesis parameters in cotyledons of sunflower (*Heliantus annuus* L). *Journal of Genetic and Breeding* 54, 227-31.
- Selitrechnikoff, C.P., Wilson, S.J., Clemons, K.V., Stevens, D.A., 2000. Zeamatin, an antifungal protein. *Current Opinion on Anti-Infection Investigational Drugs* 2, 368-74.
- Selitrechnikoff, C.P., 2001. Antifungal Proteins. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 2883-94.
- Shah, D.A., Madden, L.V., 2004. Nonparametric analysis of ordinal data in designed factorial experiments. *Phytopathology* 94, 33-43.
- Verwoerd, T.C., Dekker, M.M., Hockema, A., 1989. A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. *Nucleic Acids Research* 17, 2362.
- Wang, X., Zafian, P., Choudhary, M., Lawton, M., 1996. The PR5K receptor protein kinase from *Arabidopsis thaliana* is structurally related to a family of plant defence proteins. *Proceedings of the National Academy of Science of USA* 93, 2598-602.

Table 1
Oligonucleotide primers used for quantitative real-time RT-PCR

Sequence Name	Putative function	Accession number	Forward primer 5'-3'	Reverse primer 5'-3'
AJ539881	Protein phosphatase 2A	AJ539881	GGTGACATTACGGGCAGTT	GGCACTTCCCGCCTATACG
DH0AQA11ZA10RM1	AP2 domain transcription factor	CX946549	CAAGAACTCGGCCAATTCGT	AGGAGTAGCAAGGCACCATCA
DH0AQA17ZH04RM1	HD-Zip transcription factor	CX946945	GCAGCACATCGAGGACATCA	GGATCGCACCTCGTGGTTT
AJ412383	Tyrosine/serine/threonine protein phosphatase-related	AJ412383	AGCTTGGTGTGGTGGTGTATT	AAGGAAGTGGGAACCAAAGTTTC
DH0AB54ZD05RM1	Choline-phosphate cytidylyltransferase	CD847070	CGAACGAGCGAAGAAATCGT	TCATCGTTGCAGCATCCAA
DH0ALL29ZE12ZZM1	Pyruvate dehydrogenase E1 component alpha subunit	CD852550	GGGATTGTTGGAGCTCAGGTT	CCGATACTTCTGCGCAAAGG
DH0AGB6ZC11RM1	Thaumatococcus-like protein, putative	CX944894	TTAAGCGCGAATTCAGCTAAAGT	GGAATGCTCGAATGTCAAGGTT
DH0AC016ZD07FM1	Phenylalanine ammonia-lyase 2 (PAL2), EC: 4.3.1.5	CD849150	ACCTTCTCGCCGGTCAAGTA	ACCCGTTGTATCGGTTTGTGA
DH0AF30ZH09ZM1	Esterase/lipase/thioesterase family protein, EC: 3.1.1.3	CD855909	CCACCGTGATCTAGTGATTGCA	GGGTTCTCGAGTTCCATTGGA
AJ412452	WRKY family transcription factor	AJ412452	TTGGATTGAAGATGTCATCTGTGA	CCCTATTCAATTCTTCCACCAAA
DH0AC002ZF08FM1	MYB-related transcription factor	CD848175	CCGCCACACGCATTCTCT	CGAGCGCAGCAGCATCTA
DH0AC028ZC03FM1	MYB family transcription factor	CD850032	CCTCCCTGGCACATGAAGTT	CAAGCCGCTCCACTTCAAAG
AF282624	<i>Helianthus annuus</i> Actin	AF282624	TCAATGTTCCCGCCATGTAT	GACCACTGGCATAGAGGGAAAG

Table 2

Mean disease severity score [†] of 4 sunflower mutant lines and original line 'AS613' infected by seven isolates of *Phoma macdonaldii*

Genotypes	MA6	MA7	MP11	MP10	MP3	MP6	MP8
AS613	[‡] 6.58 ^{def} ± 0.45	7.22 ^{abc} ± 0.94	4.28 ^{gh} ± 0.57	3.55 ^h ± 0.68	6.46 ^{def} ± 0.95	7.2 ^{abc} ± 0.19	2.34 ⁱ ± 0.47
M6-894-2	6.77 ^{cde} ± 0.74	6.83 ^{cde} ± 0.84	5.16 ^{fg} ± 0.22	6.26 ^{def} ± 0.10	7.60 ^{ab} ± 0.29	7.45 ^{abc} ± 0.08	6.62 ^{def} ± 0.14
M6-133-2	5.27 ^{efg} ± 0.39	5.11 ^{fg} ± 0.84	4.46 ^{gh} ± 1.32	6.52 ^{def} ± 0.22	4.16 ^{gh} ± 0.50	5.20 ^{efg} ± 1.53	5.90 ^{def} ± 0.33
M6-54-1	1.44 ⁱ ± 0.22	5.08 ^{fg} ± 0.81	6.83 ^{cde} ± 0.43	1.76 ⁱ ± 0.49	6.12 ^{def} ± 0.33	3.53 ^h ± 0.33	6.43 ^{def} ± 0.21
M6-85-3	7.16 ^{abc} ± 0.04	7.75 ^a ± 0.92	6.94 ^{bcd} ± 0.61	6.99 ^{bcd} ± 0.57	5.93 ^{def} ± 0.17	6.21 ^{def} ± 0.27	6.85 ^{cde} ± 0.11

[†] A score of 1 (resistance) to 9 (susceptible) was given in relation to the proportion of petiole area showing necrosis, where: 1= 0-5%, 2 = 6-10%, 3 = 11-20%, 4 = 21-30%, 5 = 31-40%, 6 = 41-60%, 7 = 61-80%; 8 = 81-99% and 9 =100%, with necrosis spreading down the stem.

[‡] Average disease severity score of 36 plantlets per genotype challenged by each phoma black stem isolates, seven days after petiole inoculation.

Means followed by the same letters are not significantly different ($P=0.05$) according to Student-Newman-Keuls (SNK) test.

Table 3

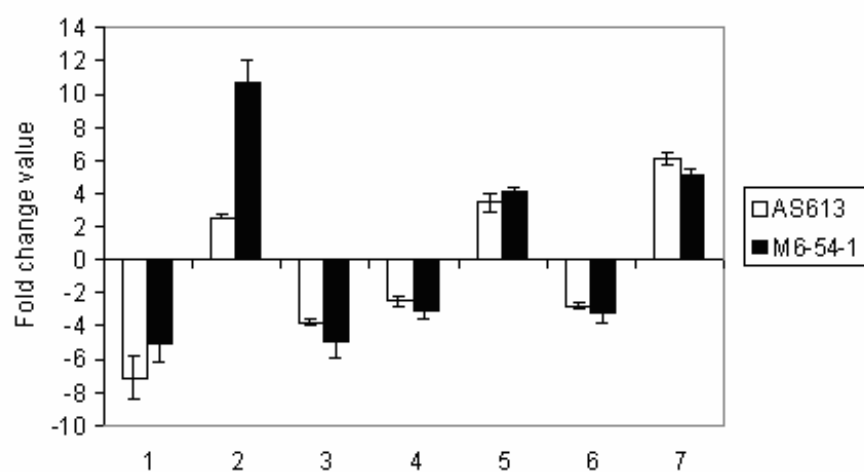
Statistical analysis for the effects of three *Phoma macdonaldii* isolates and two sunflower genotypes on the expression levels of different genes potentially regulated by Phoma infection

Putative function of genes potentially regulated by Phoma infection	df_D	Isolate		Genotype		Genotype x Isolat	
		df_N	F-Value	df_N	F-Value	df_N	F-Value
Choline-phosphate cytidyltransferase	7.49	1.83	3.62 ^{ns}	1	22.22 ^{**}	1.83	0.85 ^{ns}
AP2 domain transcription factor	10.6	1.94	15.14 ^{***}	1	152.58 ^{***}	1.94	3.98 ^{ns}
MYB-related transcription factor	6.75	1.66	48.21 ^{***}	1	13.54 ^{**}	1.66	0.44 ^{ns}
Protein phosphatase-related	9.48	1.97	15.31 ^{**}	1	9.14 [*]	1.97	6.66 [*]
PAL2, EC: 4.3.1.5	8.28	1.79	5.71 [*]	1	0.36 ^{ns}	1.79	20.17 ^{***}
HD-Zip transcription factor	4.61	1.61	0.11 ^{ns}	1	11.75 [*]	1.64	11.21 [*]
Thaumatococcus-like protein	7.20	1.74	2.22 ^{ns}	1	21.12 ^{**}	1.74	56.40 ^{***}

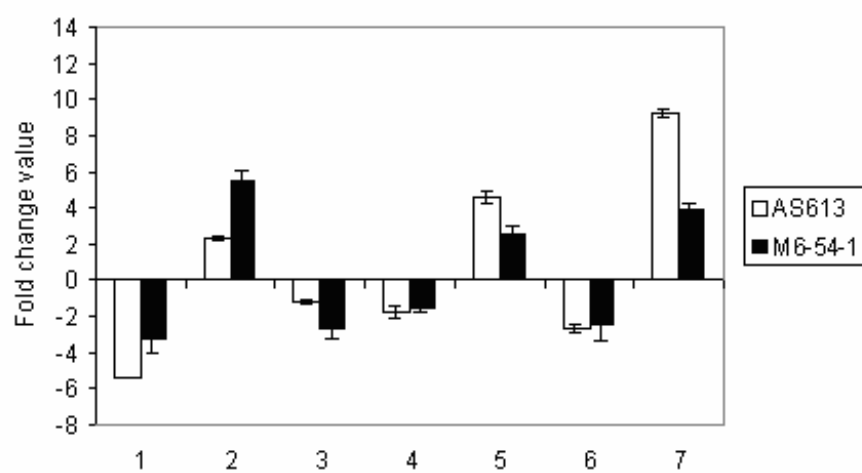
df_N = Numerator degrees of freedom; and df_D = denominator degrees of freedom.

*, ** and *** Significant at 0.05, 0.01 and 0.001 probability level.

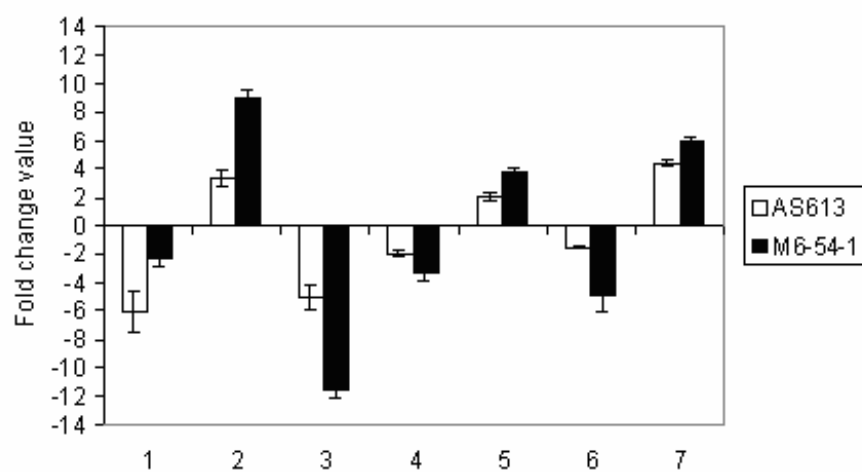
MP10 isolate



MP8 isolate



MA6 isolate



Putatively Phoma regulated genes

Fig. 1. Expression profile of genes encoding Choline-phosphate cytidylyltransferase (1), AP2 domain transcription factor (2), MYB-related transcription factor (3), Tyrosine/serine/threonine protein phosphatase-related (4), Phenylalanine ammonia-lyase 2 (PAL2) (5), HD-Zip transcription factor (6), Thaumatin-like protein (7) in original line 'AS613' and its mutant 'M6-54-1' challenged by three Phoma black stem isolates (MP10, MP8 and MA6).

Resultats et Discussion

Des mutants dont la résistance est affectée sont utilisés pour des travaux de recherche fondamentale relative aux interactions plante-agent pathogène. Dans nos études précédentes le mutant M6-54-1 a montré une résistance partielle à l'isolats MA6 par comparaison à la lignée parentelle AS613. Le même mutant possède également une sensibilité plus importante par rapport à la lignée AS613 face à l'isolat MP8. Les deux lignées M6-54-1 et AS613 ont montré une résistance partielle à l'isolat MP10. Dans le but de caractériser le mutant M6-54-1, nous avons évalué l'expression de gènes précédemment décrits pour être régulés pendant l'infection par *P. macdonaldii* (Alignan et al., 2006). Le mutant et sa lignée originelle ont été inoculés avec les isolats MP10, MP8 et MA6 de *P. macdonaldii* et la variation du niveau de l'abondance de transcription des gènes a été déterminée. Les niveaux d'expressions des gènes examinés suggèrent qu'une partie des différences entre les réponses de génotype à l'infection par le pathogène peut être attribuée aux différences quantitatives dans l'expression des gènes. Les niveaux d'expression de deux gènes codant PAL2 et thaumatin ont montré une différence significative entre les interactions compatibles et partiellement compatibles de la lignée originale AS613 et son mutant M6-54-1, inoculées par les isolats MP8 et MA6, de sorte que le degré d'induction s'est révélée plus élevé dans l'interaction partiellement compatible par rapport à l'interaction compatible. Nous n'avons observé aucune différence significative dans le niveau d'expression de ces gènes entre la lignée originelle et son mutant M6-54-1, inoculés par l'isolat MP10. Nos résultats confirment ceux d'Alignan et al. (2006) qui ont signalé que les niveaux de transcription des gènes codant PAL2 et thaumatine a étaient augmentés 48h après inoculation avec l'isolat MP6. Nos résultats sont conformes également à ceux de Mazeyrat et al. (1999) montrant que le niveau d'expression de PAL2 croit rapidement et fortement après infection du tournesol par *Plasmopara halstedii*, l'agent causal du mildiou, dans des interactions incompatibles. PAL est une enzyme clé de la voie de biosynthèse des

phénylpropanoïdes (Dorey et al., 1997). PAL catalyse la désamination non-oxydative de la phénylalanine en acide cinnamique. Cette réaction mène à la biosynthèse d'une large classe de produits secondaires chez les plantes, notamment les pigments flavonoïdes, les lignines, les hormones végétales et les phytoalexines (Smith-Becker et al., 1998; Chen et al., 2000). PAL joue également un rôle important dans la résistance des plantes aux maladies (Mauch-Mani & Slusarenko, 1996). Elle est impliquée dans une voie menant à la biosynthèse de la scopoletine (Fritig et al., 1970) et de l'ayapine, deux dérivés coumariniques, phytoalexines du tournesol. Elle est également impliquée dans la synthèse de précurseurs de matériel de type lignin, dont on pense qu'ils représentent une réaction de défense contre les pathogènes grâce à leur dépôt sur la paroi cellulaire. Des expériences avec des plantes transgéniques ont montré que l'activité PAL est un point de contrôle majeur pour la régulation de la voie des phénylpropanoïdes (Maher et al., 1994; Strack, 1997). PAL est codée par une petite famille multigénique (Cramer et al., 1989) ce qui est en accord avec l'existence d'isoformes de l'enzyme. Des thaumatines se sont révélées impliquées dans la résistance constitutive ou induite à l'attaque fongique (Selitrennikoff, 2001). Bien que le mécanisme précis de l'action des thaumatines ne soit pas complètement compris, plusieurs travaux intéressants indiquent un rôle crucial de ces protéines dans la médiation de la résistance des plantes aux maladies (Richardson et al., 1987; Wangs et al., 1996; Coca et al., 2000; Falk et al., 1999). L'analyse détaillée de l'expression de ces deux gènes à différents temps, pourrait permettre de distinguer les interactions compatibles de celles partiellement compatibles. Nous avons observé une forte corrélation entre les niveaux d'expression de deux gènes codant un facteur de transcription de types HD-Zip, une phosphatase et le symptôme de la maladie chez la lignée originelle AS163 et son mutant M6-54-1, inoculés par l'isolat MA6; le degré de répression s'est révélé plus élevé dans l'interaction partiellement compatible (M6-54-1/MA6) que compatible (AS163/MA6). La corrélation négative entre les modes d'expression de ces

composants d'éléments de signalisation et l'interaction partiellement compatible (M6-54-1/MA6) suggère que les deux gènes codant le facteur de transcription de HD-Zip et la phosphatase puissent jouer un rôle dans la résistance partielle du mutant à l'isolat MA6, en tant que les régulateurs négatifs de la réponse de défense de la plante. Nous n'avons observé aucune différence significative du niveau d'expression de ces deux gènes entre la lignée originelle et son mutant M6-54-1, inoculée par les isolats MP8 et MP10.

En conclusion, une partie de la résistance partielle dans le cas des interactions partiellement compatibles (AS613/MP10, M6-54-1/MP10, AS613/MP8 et M6-54-1/MA6) peut être associée à l'expression des gènes codant PAL2 et thaumatine, qui ont montré des variations de leurs expressions entre les interactions compatibles et partiellement compatibles chez les deux lignées de tournesol inoculées avec les isolats MP10, MP8 et MA6 du Phoma. Les gènes codant le facteur de transcription de type HD-Zip et la phosphatase peut être également impliquées dans la résistance partielle du mutant M6-54-1 à l'isolat MA6.

DISCUSSION GENERALE

1-Evaluation de la maladie

La notation des symptômes causés par un pathogène sur des génotypes naturellement infectés en plein champ peut être fiable, mais il n'est pas toujours possible de réaliser une infection uniforme. Or une infection homogène de tous les génotypes est essentielle pour l'identification précise du niveau de sensibilité de chaque génotype. Une contamination artificielle est donc indispensable pour une évaluation fiable de la résistance à la maladie des taches noires des génotypes de tournesol. La méthode d'inoculation artificielle au stade 2 paires de feuilles développée par Roustae et al. (2000a) a été utilisée dans différentes expériences au cours de cette étude. D'après les résultats des études précédentes, il n'existe pas d'interaction entre les stades phénologiques et le comportement des génotypes de tournesol (Roustae et al., 2000a; Larfeil, 2003). Les groupes de sensibilité sont en effet les mêmes quel que soit le stade de développement de la plante. De plus, le comportement variétal en champ est identique à celui observé en serre à tous les stades phénologiques (Larfeil, 2003). Ainsi, la contamination au stade 2 paires de feuilles semble prédire de manière fiable le comportement ultérieur du génotype en plein champ.

2-Variabilité génétique de la résistance partielle au Phoma chez le tournesol

La résistance de 184 génotypes de tournesol a été évaluée avec un isolat du *P. macdonaldii* (MP6) en conditions contrôlées. Il s'agit de lignées recombinantes (LRs), d'une population de mutants (120 mutants) et des génotypes de différentes origines géographiques (Annexe 1). Nous avons identifié différents groupes de génotypes qui ont montré une résistance partielle à la maladie des taches noires (Annexe 1). Ces résultats confirment l'existence d'une variabilité génétique au niveau de la résistance partielle à cette maladie, précédemment démontrée par les expérimentations en champ (Pérès et al. 1994) et en conditions contrôlées (Roustae et al., 2000a; Rachid Al-Chaarani et al., 2002; Abou Al Fadil et al., 2004; Bert et al., 2004).

La variabilité génétique observée parmi les lignées de mutants pour la résistance partielle au Phoma, révèle l'efficacité de l'irradiation gamma pour induire des mutants résistants à cette maladie. Des rayons gamma ont été largement utilisés pour induire des mutant résistants aux maladies dans des programmes génétiques et d'amélioration des plantes, par exemple pour induire la résistance à la rouille chez le blé (Skorda, 1977), au *Phytophthora* chez le sésame (Pathirana, 1992) au *Fusarium* et *Ascochyta* chez le pois chiche (Ahloowalia et al., 2004). Chez le tournesol, l'irradiation gamma a permis d'obtenir des mutants morphologiques (Nabipour et al., 2004) et des modifications au niveau de germination (Alejo-Jaimes et al., 2004). A notre connaissance, aucun mutant de tournesol résistant à des maladies n'a été décrit dans la littérature.

3-Interaction isolat-génotype:

Pour mener à bien cette étude, nous avons choisi 7 isolats du Phoma présentant des différences d'agressivité. Il s'agit des isolats MA6, MA7, MP3, MP6, MP8, MP10 et MP11. Le matériel végétal utilisé comprend 28 génotypes, des lignées recombinantes, des mutants ainsi que des génotypes de différentes origines géographiques, toutes ces lignées sont homozygotes et génétiquement éloignées de façon à disposer d'un matériel végétal très différent. Chacune des 28 lignées est contaminée avec chacun des 7 isolats. Les résultats ont montré qu'il existe des différences significatives entre les isolats, entre les lignées ainsi qu'une forte interaction isolat/génotype. Les lignées, indépendamment des isolats, présentent une sensibilité différente face au Phoma. Les lignées B454/03, ENSAT-B5 et LC1064C ont été sensibles à tous les isolats tandis que les deux lignées Américaines SDR19 et SDR18 ont montré une résistance à tous les isolats. Les autres génotypes étaient des génotypes moyennement sensibles à l'ensemble des isolats. Ceci est en accord avec des travaux précédents, dans lesquels une grande variabilité génétique au niveau de la résistance partielle entre les génotypes de tournesol vis-à-vis de cette maladie a été observée. De même, les isolats, indépendamment

des lignées, présentent une agressivité différente. Ces résultats confirment la variabilité déjà observée précédemment (Routae et al., 2000b; Larfeil, 2003). L'interaction qui existe entre les isolats et les lignées signifie que la sensibilité d'un génotype donnée peut être différente selon l'isolat utilisé. Grâce à la méthode “median polish”, deux lignées ont été identifiées, AS613 et PAC2, avec une résistance spécifique à l'isolat MP8. Cette étude montre que la variabilité du Phoma se révèle en présence de l'hôte. En fonction de l'isolat, la sensibilité des génotypes peut changer. Ceci laisse supposer l'existence de pathotypes potentiels. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Larfeil (2003), qui a démontré l'existence d'une importante variabilité au niveau de la résistance partielle, selon les isolats du Phoma et les lignées de tournesol. Ce type d'interaction existe également chez d'autres champignons tels que *Phomopsis helianthi*. Ces résultats montrent l'importance de disposer de souches représentatives de la diversité du champignon pour la réalisation de programmes de sélection fiables. Viguié et al. (1999) avec le pathosystème *Phomopsis*/tournesol ont mis en évidence un effet isolat ainsi qu'un effet génotype, avec quelques changements dans l'ordre des hybrides. Cependant, ces changements ne sont pas majeurs et ne provoquent pas d'inversion de classement dans l'échelle de résistance comme cela est le cas pour le Phoma. Ballinger et Salisbury (1996) ont, quant à eux, mis en évidence une interaction *Leptosphaeria maculans*/Brassica sp, avec la découverte de 14 races pour le stade semis et 7 races pour le stade plantes adultes.

4-Génétique de la résistance partielle du tournesol au Phoma

L'aptitude générale à la combinaison (AGC) et l'aptitude spécifique à la combinaison (ASC) ont été étudiées chez cinq génotypes parmi les 28 de la première expérimentation présentant une variabilité importante pour la résistance partielle aux isolats du Phoma et leurs 10 hybrides F1. Les génotypes parentaux et leurs hybrides F1 ont été inoculés par deux isolats sélectionnés (MP8 et PM10). L'interaction entre les isolats du Phoma et les génotypes de

tourne-sol a confirmé les résultats précédents concernant l'existence d'interaction isolat-génotype et l'existence des gènes différents impliqués dans la résistance partielle des génotypes de tourne-sol aux isolats étudiés. Les effets significatifs d'AGC et ASC montrent l'importance des composants génétiques additifs et non additifs qui contrôlent la résistance partielle aux isolats du Phoma. Cependant, pour les isolats étudiés, les ratios SC(AGC)/SC(ASC) montrent la prépondérance des effets additifs dans le contrôle génétique de la résistance partielle. Ceci est en accord avec des travaux précédents où l'AGC était plus importante que l'ASC (Roustaei et al., 2000a). Selon les génotypes, la valeur de l'AGC est variable, positive ou négative et significative. Une valeur négative pour l'AGC indique la contribution vers la résistance, tandis qu'une valeur positive représente l'opposé. Ainsi, un haut niveau de résistance partielle aux deux isolats étudiés, peut être obtenu en effectuant des croisements entre des génotypes avec une valeur négative pour l'AGC. Le génotype M6-54-1 a montré sa capacité à transmettre à la fois la résistance à l'isolat MP10 et la sensibilité à l'isolat MP8, dans sa descendance par hybridation avec d'autres génotypes. D'autre part, ENSAT-R5 a montré sa capacité à transmettre la résistance à l'isolat MP8 et la sensibilité à l'isolat MP10. Le croisement entre M6-54-1 et ENSAT-R5, pourrait donc permettre d'améliorer la résistance à ces deux isolats du Phoma.

5-Identification des QTLs impliqués dans la résistance partielle au Phoma

5-1-Utilisation des deux cartes génétiques

Une forte variabilité génétique observée pour la résistance partielle chez les populations RILs et familles F3 vis-à-vis des isolats du *P. macdonaldii* nous a conduit à identifier les régions génomiques impliquées dans la résistance partielle aux isolats du Phoma. Le Tableau 1 récapitule les QTLs pour la résistance partielle au *P. macdonaldii* mis en évidence en utilisant les deux cartes génétiques de tourne-sol qui présentent toutes les deux la même nomenclature

des groupes de liaison. Tous les groupes de liaisons sauf les groupes 3, 4, 6, 12 et 13 portent des QTLs. Ces résultats confirment les observations précédentes sur la nature polygénique de la résistance qui présente une gamme continue de variation dans les phénotypes. Les variances phénotypiques dues à l'effet des QTLs varient de 4% à 42% pour les différents isolats. Nous avons observé que les QTLs (*bsrMA6.8.1* et *bsrMP6.8.1*) de la résistance partielle aux isolats MA6 et MP6, co-localisés sur le groupe de liaison 8 de nouvelle carte génétique ont un effet majeur de l'ordre de 34 et 42%. Nous avons également observé que les deux lignée parentales contribuent dans les deux cas à la résistance partielle aux différents isolats. Ceci montre que les allèles augmentant ou diminuant la résistance partielle sont dispersés dans les lignées parentales, et que l'accumulation d'allèles favorables dans la descendance peut donc générer des génotypes plus performants que les parents. Ceci confirme la ségrégation transgressive observée au niveau phénotypique.

La comparaison des positions des QTLs impliqués dans la résistance aux isolats du Phoma a montré une co-localisation des QTL. Cependant certains QTLs sont spécifiques car ils interviennent dans les mécanismes de défense vis-à-vis de certains isolats. La co-localisation des QTLs indique l'implication de la même région génomique dans la résistance à différents isolats. Le terme de QTL non spécifique fait référence à des QTLs qui pourraient être importants dans les mécanismes généraux de défense vis-à-vis de *P. macdonaldii*. Ce type de résistance peut être expliqué par l'action de seulement un gène avec un effet pléiotrope, ou par la liaison entre des gènes distincts à effets relatifs (Caranta et al., 1997).

La comparaison des QTLs de deux cartes génétiques montre que les groupes de liaison 1, 5, 8, 9 et 10 ont contribué dans la résistance partielle aux isolats du Phoma chez les deux population étudiés (LRs et F2:F3). L'accumulation de QTLs 'isolat-non-spécifiques' avec des 'isolat-spécifiques' pourrait augmenter le niveau de résistance à tout un ensemble d'isolats et la probabilité d'une résistance durable.

5-2-Association de marqueurs et résistance

La population de mutants utilisée dans notre étude précédente a présenté une importante variabilité génétique pour la résistance partielle au Phoma. Une étude génétique a été réalisée afin de rechercher les marqueurs moléculaires liés à la résistance partielle du tournesol au Phoma. L'étude des profils moléculaires de ces mutants a été réalisée par la technique AFLP en utilisant 17 combinaisons d'amorces EcoRI/MseI. L'association entre les marqueurs AFLP et les observations de sévérité de la maladie a été estimée par analyse de régression multiple par étapes. Huit marqueurs d'AFLP liés à la résistance partielle à la maladie des taches noires ont été identifiés. Les effets cumulatifs des 8 marqueurs significatifs (R^2) ont expliqué 64.36% de la variation phénotypique. Trois marqueurs, 'E33M61_8', 'E33M48_5', 'E33M60_6' expliquent des proportions importantes de variation de sensibilité à la maladie des taches noires. La prévision de la performance de tous les mutants pour la sensibilité à la maladie basée sur leurs profils de marqueurs a prouvé que leurs différences avec des valeurs observées ne sont pas significatives. Des études d'association ont été employées chez plusieurs espèces pour identifier les marqueurs moléculaires liés aux différents caractères (Virk et al., 1996; Roy et al., 2006; Vijayan et al., 2006). Les marqueurs d'AFLP associés à la résistance partielle à la maladie des taches noires, peuvent fournir des informations intéressantes pour la sélection assistée par marqueurs. Cependant, les marqueurs identifiés dans la présente étude doivent être soumis à validation.

6-Analyse de l'expression de gènes de défense

Après avoir étudié l'interaction isolat-génotype et l'« isolat-spécificité » de la résistance partielle au Phoma, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'expression des gènes impliqués dans le mécanisme de défense dans le cas des interactions compatibles et partiellement compatibles du pathosystème Phoma-Tournesol. Pour mener à bien cette étude, nous avons travaillé avec deux lignées de sensibilité opposées aux deux isolats de *P. macdonaldii*. Il s'agit

du mutant M6-54-1, qui est résistant à l'isolat MA6 et sensible à l'isolat MP8, et de sa lignée d'origine AS613 qui montre une résistance à l'isolat MP8 mais une sensibilité à l'isolat MA6. D'autre part, les deux lignées M6-54-1 et AS613 ont montré une résistance partielle à l'isolat MP10. Le mutant et la lignée originale ont été inoculés avec les isolats MP10, MP8 et MA6 de *P. macdonaldii* et le profil de 12 gènes liés à la résistance partielle du tournesol au *P. macdonaldii*, récemment identifiés dans notre département, a été déterminé (Alignan et al., 2006). Les profils d'expression de deux gènes codant PAL2 et thaumatine ont montré une différence significative entre les interactions compatibles et partiellement compatibles de la lignée originelle AS613 et de son mutant M6-54-1 inoculées par les isolats MP8 et MA6, de sorte que le degré d'induction a été plus élevé dans l'interaction partiellement compatible que dans celle de compatible. Nous n'avons observé aucune différence significative dans le niveau d'expression de ces gènes entre la lignée originale et son mutant M6-54-1 inoculés par l'isolat MP10, qui avaient montré une résistance partielle à cet isolat. L'induction de ces gènes reliés à la défense dans les conditions étudiées, suggèrent un rôle essentiel pour eux dans un mécanisme de base de la défense. Nos résultats confirment ceux d'Alignan et al. (2006) qui ont signalé que les niveaux de transcription des gènes codant PAL2 et thaumatine étaient augmentés 48h après inoculation avec l'isolat MP6. Nos résultats sont conformes également à ceux de Mazeyrat et al. (1999) montrant que le niveau d'expression de PAL2 augmentait rapidement et fortement après infection du tournesol par *Plasmopara halstedii*, l'agent causal du mildiou, dans des interactions incompatibles, mais pas dans celles compatibles. L'analyse détaillée de l'expression de ces deux gènes au cours du temps pourrait être utile pour distinguer les interactions compatibles de celles partiellement compatibles.

L'expression de deux gènes codant un facteur de transcription de type HD-Zip et une phosphatase, s'est avéré réprimée dans toutes les interactions génotype-isolat. Nous avons observé une forte corrélation entre les niveaux de répression de ces gènes et le symptôme de

la maladie chez la lignée originale AS163 et son mutant M6-54-1, inoculés par l'isolat MA6, de sorte que le degré de répression s'est révélé plus élevé dans le cas de l'interaction partiellement compatible (M6-54-1/MA6) que compatible (AS163/MA6). La corrélation négative entre les modes d'expression de ces composants de signalisation et l'interaction partiellement compatible (M6-54-1/MA6) suggère que ces gènes puissent jouer un rôle dans la résistance partielle à l'isolat MA6, en tant que les régulateurs négatifs de la réponse de défense de la plante. Nous n'avons observé aucune différence significative en terme de niveau d'expression de ces gènes entre la ligne originale et son mutant M6-54-1, inoculés par les isolats MP8 et MP10.

La répression de certains de ces gènes de défense, dans les combinaisons génotype-isolat étudiés, implique l'inhibition active des gènes de plante après une infection par l'agent pathogène. Cependant, le niveau de l'inhibition change en fonction des paires génotype/isolat utilisées. Il est probable que l'inhibition des gènes de la plante soit une étape essentielle pour une pathogénie efficace (Caldo et al., 2004). D'autres études sont nécessaires afin de préciser le mécanisme de l'inhibition de ces gènes. Elles fourniront de nouvelles information concernant les différences entre les interactions compatibles et incompatibles dans le pathosystème Phoma-Tournesol.

Perspectives

Au cours de nos travaux de recherche, de nouvelles sources de résistance au Phoma ont été identifiées. Nous avons également mis au point les deux aspects « isolat-spécificité » et non-spécificité de la résistance partielle chez les génotypes résistants et finalement identifié les régions génomiques impliquées dans la résistance partielle aux isolats du Phoma. En parallèle, nous avons étudié le profil de l'expression des gènes potentiellement associés à la résistance partielle du tournesol au *P. macdonaldii* dans les interactions compatibles et partiellement

compatibles, chez le mutant M6-54-1 et la lignée originelle. Ce travail pourrait être développé selon différents axes:

1- Les résultats de l'étude de l'interaction génotype-isolat montrent l'importance de disposer des souches représentatives de la diversité du Phoma et de mettre en avant la nécessité d'identifier les pathotypes potentiels du champignon afin de les prendre en compte pour la réalisation de programmes de sélection fiables. Dans cet objectif, il s'agit de travailler sur un large panel représentant la diversité génétique de l'agent pathogène. Cette collection devra être, autant que possible, représentative des populations de l'agent pathogène venant de pays où le Phoma provoque de dégâts importants.

2- Une population de LR_s peut être créée à partir des familles F₃ de notre carte, ce qui nous permettra d'enrichir le matériel génétique pour des études ultérieures.

3- L'interaction génotype × environnement est associée à une résistance quantitative (Dingerdissen et al., 1996). Il serait donc nécessaire d'effectuer des essais en champ afin d'identifier les QTLs les plus stables qui apporteraient la résistance la plus durable contre *P. macdonaldii*.

4- Afin d'identifier précisément les zones du génome impliquées dans l'expression de la résistance partielle au Phoma, il est envisageable d'enrichir ces zones par les SSRs et de réaliser des croisements entre les RILs présentant un polymorphisme dans l'intervalle des zones identifiées. Après une recombinaison génétique, il devrait être possible d'identifier des lignées présentant des recombinaisons dans les zones en question et d'évaluer la résistance de ces lignées, ce qui permettrait d'identifier les marqueurs SSRs étroitement liés au caractère étudié.

La carte génétique obtenue à partir du croisement PAC2 x RHA266 contient actuellement 191 SSR. Des efforts devront être déployés dans la recherche de polymorphisme des marqueurs SNP et SSCP, et pour le marquage des zones du génome que nous avons identifiées pour

l'expression de la résistance aux isolats du Phoma. Le premier objectif est l'utilisation d'un ensemble de gènes que l'on peut cartographier physiquement, dans une banque BAC disponible au laboratoire BAP. Le deuxième objectif peut être la mise en place d'une stratégie de cartographie fine et la réalisation de « contigus » de BAC au voisinage des QTLs co-localisés pour le contrôle génétique de différents isolats du Phoma, ce qui permettrait d'envisager un clonage positionnel.

L'identification de gènes candidats pour la résistance aux différents isolats du Phoma, leur co-localisation avec les QTLs et enfin, leur validation au sein d'études d'association en populations naturelles fourniront des outils de grand intérêt pour l'étude de la diversité de la résistance partielle intra et interspécifique chez le tournesol.

5- Les marqueurs identifiés chez le mutant M6-54-1 et la lignée d'origine, dans l'étude d'association, doivent être validées. Pour ceci, des marqueurs identifiés doivent être transformés en marqueurs spécifiques tels que les CAPs. Ces marqueurs peuvent être employés pour génotyper une population en ségrégation venant du croisement entre un mutant résistant et sa lignée originelle. L'identification des QTL dans une telle population montrera l'exactitude des marqueurs identifiés et leur utilisation dans des programmes de sélections assistée par marqueurs.

6- L'analyse de l'expression d'un plus grand nombre de gènes à l'aide de techniques microarray peut aider à mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la défense face à cette maladie. Cette technique peut être employée pour: a) analyser l'expression des gènes en utilisant les génotypes contrastés et corrélér le niveau d'expression des gènes avec la réponse phénotypique (observation des niveaux de sévérité de la maladie) ou, b) analyser l'expression des gènes sur toutes les lignées recombinantes (LRs) ou sur les individus F2 pour identifier les QTL contrôlant l'expression des gènes (eQTL). Ce dernier point permettrait de localiser

les QTLs impliqués dans l'expression différentielle globale des gènes et, par conséquent, d'associer la variation phénotypique avec la variation transcriptomique.

7- Il serait également intéressant d'effectuer l'analyse du transcriptome au cours du temps en mesurant le niveau de transcription à différents temps durant l'interaction plante-agent pathogène et de relier ces derniers au développement de l'agent pathogène.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abou Al Fadil T, Dechamp-Guillaume G, Poormohammad Kiani S, Sarrafi A, 2004.

Genetic variability and heritability for resistance to black stem (*Phoma macdonaldii*) in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Journal of Genetic and Breeding 58, 323-328.

Acimovic M, 1984. Sunflower diseases in Europe, the United States and Australia. Helia 7, 45-54.

Alignan M, Hewezi T, Petitprez M, Dechamp-Guillaume G, Gentzbittel L, 2006. A cDNA microarray approach to decipher sunflower (*Helianthus annuus* L.) responses to the necrotrophic fungus *Phoma macdonaldii*. New Phytologist 170, 523-36.

Alejo-Jaimes A, Jardinaud MF, Maury P, Alibert G, Gentzbittel L, Sarrafi A, Grieu P, Petitprez M, 2004. Genetic variation for germination and physiological traits in sunflower mutants induced by gamma rays. Journal of Genetic and Breeding 58, 285-294.

Arraiano LS, Brown JKM, (2006) Identification of isolate-specific and partial resistance to septoria tritici blotch in 238 European wheat cultivars and breeding lines. Plant Pathology 55, 726-738.

Ahloowalia BS, Maluszynski M, 2001. Induced mutations-a new paradigm in plant breeding. Euphytica 118, 167-173

Ahloowalia BS, Maluszynski M, Nichterlein K, 2004. Global impact of mutation-derived varieties. Euphytica 135, 187-204

Ballinger DJ, Salisbury PA, 1996. Seedling and adult plant evaluation of race variability in *Leptosphaeria maculans* on *Brassica* species in Australia. Australian Journal of Experimental Agriculture 36, 485-488.

Barrault G, 1989. L'helminthosporiose de l'orge causée par *Drechslera teres*. Toulouse, France: Institut National Polytechnique, PhD Thesis.

Basten CJ, Weir BS, Zeng ZB, 2002. QTL Cartographer, version 1.16: program in statistical genetics. North Carolina State University, Raleigh.

- Ben-Chaim A, Grube RC, Lapido M, Jahn M, Paran I, 2001.** Identification of quantitative trait loci associated with resistance to cucumber mosaic virus in *Capsicum annuum*. Theoretical and Applied Genetics 102, 1213-1220
- Bert P-F, Dechamp-Guillaume G, Serre F, Jouan I, Tourvieille de Labrouhe D, Nicolas P, Vear F, 2004.** Comparative genetic analysis of quantitative traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.) 3. Characterisation of QTL involved in resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Phoma macdonaldii*. Theoretical and Applied Genetics 109, 865-874.
- Boerema GH, 1970.** Additional notes on *Phoma herbarum*. Persoonia 6, 15-45.
- Bostein D, White RL, Skolnick M, David RW, 1980.** Construction of genetic maps in man using restrict fragment lenght polymorphisms. Am J Hum Genet 32, 314-331
- Boyd LA, Smith PH, Foster EM, Brown JKM, 1995.** The effects of allelic variation at the *Mla* resistance locus in barley on the early development of *Erysiphe graminis* f. sp. hordei and host responses. The Plant Journal 7, 959-968.
- Boyd LA, Smith PH, Wilson AH, Minchin PN, 2002.** Mutations wheat showing altered field resistance to yellow and brown rust. Genome 45, 1035-1040.
- Brown JKM, Kema GHJ, Forrer HR, Verstappen ECP, Arraiano LS, Brading PA, Foster EM, Fried PM, Jenny E, 2001.** Resistance of wheat cultivars and breeding lines to septoria tritici blotch caused by isolates of *Mycosphaerella graminicola* in field trials. Plant Pathology 50, 325-338.
- Brunner H, 1995.** Radiation induced mutations for plant selection. Applications of Radiated Isotopes 46, 589-594.
- Burr B, Burr F, 1991.** Recombinant inbred lines for molecular mapping in maize: theoretical and practical considerations. Trends in Genetics 7, 55-60
- Bustin SA, 2002.** Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. Journal of Molecular Endocrinology 29, 23-39.

- Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaff MW, 2005.** Quantitative real-time RT-PCR—a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology* 34, 597–601.
- Caldo RA, Nettleton D, Wise RP, 2004.** Interaction-Dependent Gene Expression in Mla-Specified Response to Barley Powdery Mildew. *Plant Cell* 16, 2514-2528.
- Cagirgan MI, 2006.** Selection and morphological characterization of induced determinate mutants in semase. *Field Crop Research* 96, 19-24.
- Carson ML, 1991.** Relationship between Phoma black stem severity and yield losses in hybrid sunflower. *Plant Disease* 75, 1150-1153.
- Castiglioni P, Ajmone-Marsan P, van Wijk R, Motto M, 1999.** AFLP markers in a molecular linkage map of maize: codominant scoring and linkage group distribution. *Theoretical and Applied Genetics* 99, 425-431.
- Chargué V, Fahima T, Dahan A, Sun GL, Korol AB, Ronin YI, Grama A, Röder MS, Nevo E 1999.** Isolation of microsatellite and RAPD markers flanking the Y-15 gene of wheat using Nils and bulked segregant analysis. *Genome* 42, 1050-1056
- Chartrain L, Brading PA, Makepeace JC, Brown JKM, 2004a.** Sources of resistance to septoria tritici blotch and implications for wheat breeding. *Plant Pathology* 53, 454 -460.
- Chartrain L, Brading PA, Widdowson JP, Brown JKM, 2004b.** Partial resistance to septoria tritici blotch (*Mycosphaerella graminicola*) in wheat cultivars Arina and Riband. *Phytopathology* 94, 497-504.
- Chen M, McClure JW, 2000.** Altered lignin composition in phenylalanine ammonia-lyase-inhibited radish seedlings: implications for seed-derived sinapoyl esters as lignin precursors. *Phytochemistry* 53, 365-370.
- Cho S, Chen W, Muehlbauer FJ, 2004.** Pathotype-specific genetic factors in chickpea (*Cicer arietinum* L.) for quantitative resistance to ascochyta blight. *Theoretical and Applied Genetics* 109, 733-9.

Coca MA, Damsz B, Yun DJ, Hasegawa PM, Bressan RA, Narasimhan ML, 2000.

Heterotrimeric G-proteins of a filamentous fungus regulate cell wall composition and susceptibility to a plant PR-5 protein. *The Plant Journal* **22**, 61-9.

Cramer CL, Edwards K, Dron M, Liang X, Dildine SL, Bolwell GP, Dixon RA, Lamb

CJ, Schuch W, 1989. Phenylalanine ammonia-lyase gene organisation and structure. *Plant Molecular Biology* **12**, 367-383.

Darvasi A, 1998. Experimental strategies for the genetic dissection of complex traits in animal models. *Nature Genetics* **18**, 19 - 24.

De Givry S, Bouchez M, Chabrier P, Milan D, Schiex T, 2005. CARTHAGENE: multi-population integrated genetic and radiation hybrid mapping. *Bioinformatics* **21**, 1703–4.

Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB, 1985. Maize DNA minipreps. In: Malberg NY, Messing J, Sussex I, (Eds.), *Molecular Biology of Plants*. Cold Spring Harbor, pp 36-7.

De Vienne D, Causse M, 1998. La cartographie et la caractérisation des locus contrôlant la variation des caractères quantitatifs. In: *Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales*. Edit INRA 200 p.

De Vienne D, Santoni S, 1998. Les principales sources de marqueurs moléculaires. In: *Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales*. Edit INRA 200 p.

Dominguez, J. 1996. R-41, a sunflower restorer inbred line, carrying two genes for resistance against a highly virulent Spanish population of *Orobanche cernua*. *Plant Breeding* **115**, 203–204.

Donald PA, Venette JR, Gulya TJ, 1987. Relationship between *Phoma macdonaldii* and premature death of sunflower. *Plant Disease* **71**, 466-468.

Dorey S, Baillieul F, Pierrel MA, Saindrenan P, Fritig B, Kauffmann S, 1997. Spatial and temporal induction of cell death, defense genes, and accumulation of salicylic acid in

- tobacco leaves reacting hypersensitively to a fungal glycoprotein elicitor. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 10, 646-655.
- Dowd C, Wilson IW, McFadden H, 2004.** Gene expression profile changes in cotton root and hypocotyl tissues in response to infection with *Fusarium oxysporum* f. sp. vasinfectum). *Molecular Plant-Microbe Interaction* 17, 654-667.
- Duggal V, Jellis GJ, Hollins TW, Stratford R, 2000.** Resistance to powdery mildew in mutant lines of the susceptible wheat cultivar Hobbit 'sib'. *Plant Pathology* 49, 468-476.
- Evans DA, 1989.** Somaclonal variation – genetic basis and breeding applications. *Trends in Genetics* 5, 46-50.
- Falconer DS, Mackay TFC, 1997.** *Introduction to Quantitative Genetics*. Longman Press, Essex.
- Falk A, Feys B, Frost LN, Jones JDG, Daniels MJ, Parker JE, 1999.** An essential component of R gene-mediated disease resistance in *Arabidopsis* has homology to eukaryotic lipases. *Proceedings of the National Academy of Science of USA* 96, 3292-7.
- Fayret J, Quenin H, Perny A, 1996.** Evolution de l'état sanitaire des semences de tournesol, conséquence des attaques de capitules par *Phomopsis helianthi* et *Phoma macdonaldii*. *Phytoma, la Défense des Végétaux* 487, 37-40.
- Feys BJ, Moisan LJ, Newman MA, Parker JE, 2001.** Direct interaction between the *Arabidopsis* disease resistance signalling proteins, EDS1 and PAD4. *The EMBO Journal* 20, 5400-11.
- Fayzalla S, Maric A, 1981.** Contribution à l'étude de la biologie et de l'épidémiologie de *Phoma macdonaldii* Boerema provoquant la maladie des taches noires du tournesol. *Zastita Bilja* 32, 13-27.

- Flores Berrios E, Gentzbittel L, Kayyal H, Alibert G, Sarrafi A, 2000.** AFLP mapping of QTLs for in vitro organogenesis traits using recombinant inbred lines in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Theoretical and Applied Genetics 101, 1299-1306
- Frezzi MJ, 1968.** *Leptosphaeria lindquisti* n.sp., forma sexual de *Phoma oleracea* var. *helianthi-tuberosi* Sacc., hongo causal de la ‘mancha negra del tello’ del girasol (*Helianthus annuus* L.) en Argentina. Revista de Investigaciones Agropecuarias 5, 77-80.
- Fritig B, Hirth L, Ourisson G, 1970.** Biosynthesis of the coumarins: scopoletin formation in tobacco tissue cultures. Phytochemistry 9, 1963-75
- Gamble EE, 1962.** Gene effects in corn (*Zea mays* L.) I. Separation and relative importance of gene effects for yield. Canadian Journal of Plant Science 42, 339-348.
- Gaudet, MD, Schultz TJ, 1984.** Association between a sunflower fungal pathogen, *Phoma macdonaldii*, and a stem weevil *Apion occidentalis* (Coleoptera, Curculionidae). Journal of Economic Entomology 116, 1267-73.
- Gedil MA, Berry SK, Jones R, Leon A, Wye C, Peleman J, Knapp SJ, 2001.** An integrated RFLP-AFLP linkage map for cultivated sunflower. Genome 44, 213-221
- Gentzbittel L, Vear F, Zhang Y-X, Bervillé A, Nicolas P, 1995.** Development of a consensus linkage RFLP map of cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.). Theoretical and Applied Genetics 90, 1079–1086.
- Griffing B, 1956.** Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing systems. Aust. J. Biol. Sci. 9, 463- 493.
- Guilford A, Prakash S, Zhu JM, Rikkerink E, Gardiner S, Bassett H, Forster R, 1997.** Microsatellites in *Malus x domestica* (apple): abundance polymorphism and cultivar identification. Theoretical and Applied Genetics 94, 245-249
- Haley CS, Knott SA, 1992.** A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. Heredity 69, 315–324.

- Hallauer AR, Miranda Fo JB 1981.** Quantitative Genetics in Maize Breeding. Iowa State University Press, Ames.
- Haanstra JPW, Wye C, Verbakel H, Meijer-Dekens F, Van den Berg P, Odinet P, van Heusden AW, Tanksley S, Lindhout P, Peleman J, 1999.** An integrated high-density RFLP-AFLP map of tomato based on two *Lycopersicon esculentum* x *L. pennellii* F2 populations. Theoretical and Applied Genetics 99, 254-271.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM, 1996.** Real time quantitative PCR. Genome Research 6, 986-94.
- Haldan JBS, 1931.** Inbreeding and linkage. Genetics 16, 357-374
- Haley CS, Knott SA, 1992.** A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. Heredity 69, 315-324
- Hardham AJ, 2001.** Cell biology of fungal infection of plants. In The Mycota: Biology of the Fungal Cell, Vol. VIII, R.J. Howard and N.A.R. Gow, eds. (New York: Springer-Verlag), pp. 91-124.
- Heiser CB, 1961.** Natural hybridization and introgression with particular reference to *Helianthus*. Rec. Adv. Bot. 1, 874-877.
- Hervé D, Fabre F, Flores Berrios E, Leroux N, Al Chaarani G, Planchon C, Sarrafi A, Gentzbittel L, 2001.** QTL analysis of photosynthesis and water status traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.) under greenhouse conditions. J Exp Bot 52, 1857-1864.
- Hill J, Becker HC, Tigerstedt PMA, 1998.** Quantitative and ecological aspects of plant breeding. Chapman & Hall, London.
- Holloway JL, Knapp SJ, 1993.** G-MENDEL 3.0: Software for the analysis of genetic markers and maps. pp. 1-130. Oregon State University, Corvallis.

- Hua Z, Ma G, 1996.** A review of sunflower diseases research of China. In: Proceedings of the 14th International Sunflower Conference, Beijing, China. Shenyang, China: Academy of Agricultural Science 2, 754-759.
- Hui D, Iqbal J, Lehmann K, Gase K, Saluz HP, Baldwin IT, 2003.** Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*: V. Microarray analysis and further characterization of large-scale changes in herbivore-induced mRNAs. *Plant Physiol.* 131, 1877–1893.
- Jeuken M, Van Wijk R, Peleman J, and Lindhout P, 2001.** An integrated interspecific AFLP map of lettuce (*Lactuca*) based on two *L. sativa* x *L. saligna* F2 populations. *Theoretical and Applied Genetics* 103: 638-647
- Jørgensen JH, 1994.** Genetics of powdery mildew resistance in barley. *Critical Review in Plant Science* 13, 97-119.
- Jouffret P, Penaud A, Taverne M, Pinochet X, Duroueix F, 2005.** Neutraliser le phomopsis et le phoma du tournesol. *Oléoscope* 80, 9-30.
- Jorgensen JH, 1992.** Discovery, characterization and exploitation of *Mlo* powdery mildew resistance in barley. *Euphytica* 63, 141-152.
- Knapp SJ, Bridges WC, Birkes D, 1990.** Mapping QTL using molecular marker linkage maps. *Theoretical and Applied Genetics* 79, 583-592.
- Kosambi DD, 1944.** The estimation of a map distance from recombination values. *Ann Eug* 12, 172-175.
- Lander ES, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly MJ, Lincoln SE, and Newburg L 1987.** MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1: 174-181
- Lander ES, Botstein D, 1989.** Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121, 185-199

- Larfeil, C. 2003.** The black stem disease of sunflower caused by *Phoma macdonaldii* Boerema: phenotypic and molecular variability, genotypes susceptibility evaluation to the disease and modality of infection. Ph.D. Thesis, National Polytechnical Institute, Toulouse, France <http://bap.ensat.fr/pages/publications/publications.htm>
- Leonards-Schippers C, Gieffers W, Schäfer-Pregl R, Ritter E, Knapp SJ, Salamini F, Gebhardt C, 1994.** Quantitative resistance to *Phytophthora infestans* in potato: a case study for QTL mapping in an allogamous plant species. Genetics 137, 67-77.
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. Methods 25, 402-408.
- Liu BH, 1998.** Statistical genomics: linkage mapping and QTL analysis. CRC Press LLC.
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. Methods 25, 402-8.
- Lufort-Buson M, Rodolphe F, Charcosset A, 1990.** De nouvelles perspectives pour l'analyse génétique des caractères quantitatifs. Amélioration des plantes. Biofutur p 42-47
- MacDonald WC, 1964.** Phoma Black Stem of Sunflower. Phytopathol. 54, 492-493.
- Madjidieh-Ghassemi S, 1988.** Studies of some important fungal diseases of sunflower in Iran. Novi Sad, Yugoslavia: Proceeding of the 12th International Sunflower Conference 2, 22-3.
- Mackill DJ, Zhang Z, Redona ED, Colowit PM, 1996.** Level of polymorphism and genetic mapping of AFLP markers in rice. Genome 39, 969-977.
- Maleck K, Levine A, Eulgem T, Morgan A, Schmid J, Lawton KA, Dangl JL, Dietrich RA, 2000.** The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. Nat. Genet. 26, 403–410.

- Maher EA, Bate NJ, Ni W, Elkind Y, Dixon RA, Lamb CJ, 1994.** Increased disease susceptibility of transgenic tobacco plants with suppressed levels of preformed phenylpropanoid products. PNAS 91, 7802-06.
- Maksem K, Kahl G, 2005.** The Handbook of Plant Genome Mapping: Genetic and Physical Mapping. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Manly KF, Olson JM, 1999.** Overview of QTL mapping software and introduction to Map Manager QT. Mammalian Genome 10: 327-334.
- Marathe R, Guan Z, Anandalakshmi R, Zhao H, Dinesh-Kumar SP, 2004.** Study of *Arabidopsis thaliana* resistance to cucumber mosaic virus using whole genome microarray. Plant Mol. Biol. 55: 501-520.
- Markel PD, Fulker DW, Benett B, Corley RP, De Fries JC, 1996.** Quantitative trait loci for ethanol sensitivity in the LSxSS recombinant inbred strain: interval mapping. Behav Genet 26, 447-458.
- Maric AD, Masiveric S, Fayzalla S, 1981.** Présence de *Leptosphaeria lindquisti* Frezzi, stade terminal du champignon *Phoma macdonaldii* Boerema, responsable de la maladie noire du tournesol en Yougoslavie (in Serbo-Croatian). Zastija bilja, 32, 329-344.
- Maric AD, Camprag D, Magirevic S, 1987.** La tacheture noire du tournesol (*Phoma macdonaldii* Boerema; synonymes: *Phoma oleracea* var. *helianthi-tuberosi* Sacc. Stade terminal: *Leptosphaeria lindquistii* Frezzi). (in Serbo-Croatian), Bolesti i stetocine suncokretai njihovo suzbijanje 37-45.
- Mauch-Mani B, Slusarenko AJ, 1996.** Production of salicylic acid precursors is a major function of Phenylalanine Ammonia-Lyase in the resistance of *Arabidopsis* to *Peronospora parasitica*. Plant cell 8, 203-212.
- Mestries E, Gentzbittel L, Tourvieille de Labrouhe D, Nicolas P, Vear F, 1998.** Analyses of quantitative trait loci associated with resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in

- sunflowers (*Helianthus annuus* L.) using molecular markers. *Molecular Breeding* 4, 215–226.
- Mazeyrat F, Mouzeyar S, Courbou I, Badaoui S, Roeckel-Drevet P, Tourvieille de Labrouhe D, Ledoigt G, 1999.** Accumulation of defence related transcripts in sunflower hypocotyls (*Helianthus annuus* L.) infected with *Plasmopara halstedii*. *European Journal of Plant Pathology* 105, 333-40.
- Micic Z, Hahn V, Bauer E, Schön CC, Knapp SJ, Tang S, Melchinger AE, 2004.** QTL mapping of *Sclerotinia* midstalk rot resistance in sunflower. *Theoretical and Applied Genetics* 109, 1474–1484.
- Micic Z, Hahn V, Bauer E, Melchinger AE, Knapp SJ, Tang S, Schön CC, 2005a.** Identification and validation of QTL for *Sclerotinia* midstalk rot resistance in sunflower by selective genotyping. *Theoretical and Applied Genetics* 111, 233–242.
- Micic Z, Hahn V, Bauer E, Schön CC, Melchinger AE, 2005b.** QTL mapping of resistance to *Sclerotinia* midstalk rot in RIL of sunflower population NDBLOSsel × CM625. *Theoretical and Applied Genetics* 110, 1490–1498.
- Mather K, Jinks JL, 1971.** Biometrical Genetics. 2ⁿ edition, Chapman & Hall, London.
- Miric E, Aiken EAB, Goulter KC, 1999.** Identification in Australia of the quarantine pathogen of sunflower *Phoma macdonaldii* (Teleomorph: *Leptosphaeria lindquistii*). *Australian Journal of Agricultural Research* 50, 325-32.
- Mokrani L, Gentzbittel L, Azanza F, Fitamant L, Al-Chaarani G, and Sarrafi A, 2002,** Mapping and analysis of quantitative trait loci for grain oil and agronomic traits using AFLP and SSR in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 106, 149-156
- Nabipour A, Yazdi-Samadi B, Sarrafi A, 2005.** Genetic control of some morphological mutant in sunflower. *J. Genet. Breed.* 58, 157-162.

- Newton-Cheh C, Hirschhorn JN, 2005.** Genetic association studies of complex traits: design and analysis issues. *Mutation Research* 573, 54–69.
- Paniego N, Echaide M, Munoz M, Fernandez L, Torales S, Faccio P, Fuxan I, Crrera M, Zandomeni R, Syarez EY, Esteban Hopp H, 2002.** Microsatellite isolation and characterization in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Genome* 45, 34–43.
- Parlevliet JE, 1979.** Component of partial resistance that reduce the rate of epidemic development. *Ann. Rev. Phytopathol.* 17, 203-222.
- Pathirana R, 1992.** Gamma ray-induced field tolerance to *Phytophthora* blight in sesame. *Plant Breeding* 108, 314-319.
- Penaud A, Pérès A, 1994.** Phoma du tournesol. *Oléoscope* 15, 37p.
- Penaud A, 1996.** Phoma du tournesol: Recherche des époques de contamination et mise au point de la protection fongicide. Pages 694-699 in: Proc. 14th Internat. Sunflower Conference. Organizing Committee of the 14th International Sunflower Conference, Beijing, China.
- Pérès A, Allard AM, Deverchère J, Penaud A, 1994.** Phoma du tournesol: étude de la protection fongicide au champ. In: Proceedings of the 4th International Conference on Plant Disease, Bordeaux, France, 1179-1185.
- Pérès A, Lefol C, 1996.** *Phoma macdonaldii* Boerema: Eléments de biologie et mise au point d'une méthode de contamination artificielle en conditions contrôlées. Pages 687-693 in: Proc. of the 14th International Sunflower Conference. Beijing, China.
- Plaschke J, Ganai MW, and Röder MS, 1995.** Detection of genetic diversity in closely relate bread wheat using microsatellites markers. *Theoretical and Applied Genetics* 91, 1001-7.
- Poormohammad Kiani S, Talia P, Maury P, Grieu P, Heinz R, Perrault A, Nishinakamasu V, Hopp E, Gentzbittel L, Paniego N, Sarrafi A, 2007.** Genetic

analysis of plant water status and osmotic adjustment in recombinant inbred lines of sunflower under two water treatments. *Plant Science* 172, 773-87.

Rachid Al-Chaarani G, Roustae A, Gentzbittel L, Mokrani L, Barrault G, Dechamp-Guillaume G, Sarrafi A, 2002. A QTL analysis of sunflower partial resistance to downy mildew (*Plasmopara halstedii*) and black stem (*Phoma macdonaldii*) by the use of recombinant inbred lines (RILs). *Theoretical and Applied Genetics* 104, 490-6.

Rachid Al-Chaarani G, Gentzbittel L, Huang, XQ, Sarrafi A, 2004. Genotypic variation and identification of QTLs for agronomic traits, using AFLP and SSR markers in RILs of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theoretical Applied Genetics* 109, 1353-60.

Rae J, Aldam C, Dominguez I, Hoebrechts M, Barnes SR, Edwards KJ, 2000. Development and incorporation of microsatellite markers into the linkage map of sugar beet (*Beta vulgaris* spp). *Theoretical Applied Genetics* 100, 1240-1248.

Richardson M, Valdes-Rodriquez S, Blanco-Labra A, 1987. A possible function for thaumatin and a TMV-induced protein suggested by homology to a maize inhibitor. *Nature* 327, 432-4.

Rocherieux J, Glory P, Giboulot A, Boury S, Barbeyron G, Thomas G, Manzanares-Dauleux MJ, 2004. Isolate-specific and broad-spectrum QTLs are involved in the control of clubroot in *Brassica oleracea*. *Theoretical and Applied Genetics* 108, 1555-63.

Rönicke S, Hahn V, Friedt W, 2005. Quantitative trait loci analysis of resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* sunflower. *Phytopathology* 95, 834-9.

Roustae A, Barrault G, Dechamps-Guillaume G, Lesigne P, Sarrafi A, 2000a. Inheritance of partial resistance to black stem (*Phoma macdonaldii*) in sunflower. *Plant Pathology* 49, 396–401.

- Roustae A, Costes D, Dechamp-Guillaume G, Barrault G, 2000b.** Phenotypic variability of *Leptosphaeria lindquistii* (*Phoma macdonaldii*) a fungal pathogen of sunflower. Plant Pathology 49, 227–234.
- Roustae A, Barrault G, Dechamp-Guillaume G, Gelie B, Savy C, Dargent R, Barrault G, 2000c.** Ultrastructural studies of the mode of penetration by *Phoma macdonaldii* in sunflower seedlings. Phytopathology 90, 915-20.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, 1989.** Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Schilling EE, Heiser CB, 1981.** Infrageneric classification of *Helianthus* (Compositae). Taxon 30, 393-403.
- Schneiter AA, Miller JF, 1981.** Description of Sunflower Growth Stages. Crop Science 11, 635-638.
- Schenk PM, Kazan K, Wilson I, Anderson JP, Richmond T, Somerville SC, Manners JM 2000.** Coordinated plant defense responses in Arabidopsis revealed by microarray analysis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97, 11655–11660.
- Selitrennikoff CP, 2001.** Antifungal Proteins. Applied and Environmental Microbiology 67, 2883-94.
- Sensen WC, 2005.** Handbook of Genome Research. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Siddique-Mirza M, Masood AR, Ayub M, 1988.** Sunflower diseases in Pakistan in the period 1980-87. Novi Sad, Yugoslavia: Proceeding of the 12th International Sunflower Conference 2, 25.
- Singh RP, Singh S, 1992.** Estimation of genetic parameters through generation mean analysis in breadwheat. Indian Journal of Genetics 52, 369-375.
- Sokal RR, Rolf JF, 1981.** Biometry, 2nd edn. New York, USA: W.H. Freeman.

- Skorda EA, 1977.** Stem and stripe rust resistance in wheat induced by gamma rays and thermal neutrons. In: Induced mutation against plant disease, pp. 385-392. IAEA, Vienna.
- Smith-Becker J, Marois E, Huguet EJ, Midland SL, Sims JJ, Keen NT, 1998.** Accumulation of salicylic acid and 4-hydroxybenzoic acid in phloem fluids of cucumber during systemic acquired resistance is preceded by a transient increase in phenylalanine ammonia-lyase activity in petioles and stems. *Plant Physiol.* 116, 231-238.
- Sprague GF, 1983.** Heterosis in maize: theory and practice. In: Frankel R (ed) Heterosis, Monographs on Theoretical and Applied Genetics 6, 46-70. Springer Verlag, Berlin.
- Stam P, 1993.** Construction of integrated genetic linkage maps by mean of a new computer package: JonMap. *Plant J.* 3, 739-744.
- Strack D, 1997.** Phenolic metabolism. In: Dey PM, Harborne JB, (eds.), *Plant Biochemistry*. Academic Press/ Harcourt & Company Publishers, New York, pp. 387-416.
- Struss D, Plieske J, 1998** The use of microsatellite markers for detection of genetic diversity in barley populations. *Theoretical and Applied Genetics* 97, 308-315
- Talukder ZI, Tharreau D, Price AH, 2004.** Quantitative trait loci analysis suggests that partial resistance to rice blast is mostly determined by race-specific interactions. *New Phytologist* 162, 197-209.
- Tang S, Yu JK, Slabaugh MB, Shintani DK, Knapp SJ, 2002.** Simple sequence repeat map of the sunflower genome. *Theoretical and Applied Genetics* 105, 1124-36.
- Tani T, 2001.** Perception of pathogen signals to initiate active defense. In: Keen NT, Mayama S, Leach JE, Tsuyumu S (eds.), *Delivery and perception of pathogen signals in plants*. The American Phytopathological Society Press.
- Temnykh S, Park WD, Ayres N, Cartinhour S, Hauck N, Lipovich L, Cho YG, Johü T, Mc Couch SR, 2000** Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice. *Theoretical and Applied Genetics* 100, 697-712.

- Testolin R, Huang WF, Lain O, Messina R, Vecchionea Cipriani G, 2001.** A kiwi fruit (*Actinidia* spp). Linkage map based on microsatellite and integrated with AFLP markers. Theoretical and Applied Genetics 103, 30-36
- Tucker SL, Talbot NJ, 2001.** Surface attachment and pre-penetration stage development by plant pathogenic fungi. Annu. Rev. Phytopathol. 39, 385-417.
- Tukey JW, 1977.** Explanatory data analysis. Reading, MA, USA: Addison –Wesley.
- Teulmann Neto A, de Oliveira Camargo CE, Lopes de Castro J, Ferreira Filho AWP, 2001.** Evaluation of ‘Anahuac’ wheat lines for aluminum tolerance. Euphytica 120, 339-343
- Ullstrup AJ, 1977.** Disease of corn. In: Sprague GF & Dudely JW (eds), Corn and Corn Improvement, 2nd ed., pp 391-500, Am. Soc. Agron., Madison, Wisconsin.
- Van der Planck JE, 1968.** Disease resistance in plants. Academic Press Inc., New-York and London, 206p.
- Verwoerd, T.C., Dekker, M.M., Hockema, A., 1989.** A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. Nucleic Acids Research 17, 2362.
- Viguié A, Vear F, Tourvieille de Labrouhe D, 1999.** Interactions Between French Isolates of *Phomopsis/Diaporthe Helianthi* Munt.-Cvet. et al. and Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Genotypes. European Journal of Plant Pathology 105, 693 – 702.
- Vijayan, K., Srivatsava, P.P., Nair, C.V., Awasthi, A.K., Tikader, A., Sreenivasa, B., and Urs, S.R. 2006.** Molecular characterization and identification of markers associated with yield traits in mulberry using ISSR markers. Plant Breeding 125, 298-301.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot Peleman J, Kuiper M, Zabeau M, 1995.** AFLP a new technique for DNA fingerprinting, Nucleic Acid Res 23, 4407-4414.

- Vranceanu AV, Pirova N, Stoenescu FM, Pacureanu M, 1986.** Some aspects of the interaction *Helianthus annuus* L./*Orobanche cumana* Wallr., and its implication in sunflower breeding. In Proceedings of a workshop on biology and control of Orobanche. Edited by S.J. Borg. Landbouwhogeschool, Wageningen, The Netherlands. pp. 181–189.
- Wang X, Zafian P, Choudhary M, Lawton M, 1996.** The PR5K receptor protein kinase from *Arabidopsis thaliana* is structurally related to a family of plant defence proteins. Proceedings of the National Academy of Science of USA 93, 2598-602.
- Wang YH, Thomas CE, and Dean RA, 1997.** A genetic map of melon (*Cucumis melo* L.) based on amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. Theoretical and Applied Genetics 95, 791-798
- Wastie RL, 1991.** Breeding for resistance. Advances in Plant Pathology 7, 193-224.
- Wilcoxon RD, 1981.** Genetics of slow rusting in cereals. Phytopathology 58, 605-608.
- Winter P, Pfatf T, Udupa SM, Hüttel B, Sharma PC, Salri S, Arreguin-Espinoza R, Weigand F, Muehlbauer FJ, Kahl G, 1999.** Characterization and mapping of sequence. Taget microsatellite sites in the chickpea genome. Mol Gen Genet 262, 90-101
- Yu JK, Mangor J, Thompson L, Edwards KJ, Slabaugh MB, Knapp SJ, 2002.** Allelic diversity of simple sequence repeat markers among elite inbred lines in cultivated sunflower. Genome 45, 652-660.
- Yu JK, Tang S, Slabaugh MB, Heesacker A, Cole G, Herring M, SoperJ, Han F, Chu WC, Webb DM, Thompson L, Edwards KJ, Berry S, Leon A, Olungu C, Maes N, Knapp SJ, 2003.** Towards a saturated molecular genetic linkage map for cultivated sunflower. Crop Sci 43, 367-387.
- Zeng ZB, 1993.** Theoretical basis for separation of multiple linked gene effects in mapping quantitative trait loci. Proceeding National Academy of Science USA 90, 10972-10976
- Zeng ZB, 1994.** Precision mapping of quantitative trait loci. Genetics 136, 1457-1468

ANNEXE

Annexe 1 Country of origin, mean disease severity score (scale 1-9) and disease progress rate of sunflower genotypes used in experiment for partial resistance to ‘MP6’ *Phoma macdonaldii* isolate in controlled conditions

Sunflower genotype	Type ^a	Origin ^b	DSS ^c		Speed
			Mean	SD	
ENSAT-B5	BL	F	7,34	0,27	0,31
H565R	BL	F	7,40	0,52	0,39
ENSAT-R5	BL	F	3,41	0,39	0,08
RHA274	BL	USA	4,25	0,42	0,12
H543R	BL	F	6,14	0,77	0,26
RT931	BL	F	4,66	0,93	0,14
AS5305	BL	F	4,70	0,29	0,14
ENSAT-R4	BL	F	3,70	0,34	0,09
ENSAT-B4	BL	F	6,93	0,14	0,30
LC1064C	BL	F	6,13	0,64	0,21
F651/1	BL	H	6,72	0,84	0,29
F1250/03	BL	H	2,54	0,14	0,04
B454/03	BL	H	7,51	0,38	0,24
M5-495 -1	BL	F	5,96	0,38	0,22
M5-85 -3	M	F	7,66	0,79	0,40
M5-96 -1	M	F	6,72	0,65	0,27
M5-99 -1	M	F	7,19	0,31	0,33
M5-216 -2	M	F	7,24	1,05	0,34
M5-374 -1	M	F	6,14	0,41	0,21
M5-357 -1	M	F	4,80	0,69	0,14
M5-378 -1	M	F	6,22	0,29	0,23
M5-53 -2	M	F	5,80	0,36	0,21
M5-775 -2	M	F	6,32	1,28	0,26
M5-858 -2	M	F	6,23	1,22	0,21
M4-886 -3	M	F	6,04	0,77	0,22
M5-281 -1	M	F	7,01	1,02	0,29
M5-38 -1	M	F	7,37	1,18	0,39
M5-247 -1	M	F	6,96	0,49	0,29
M5-89 -1	M	F	6,05	0,72	0,20
M5-854 -1	M	F	6,52	0,91	0,28
M5-435 -2	M	F	5,07	0,49	0,14
M5-88 -3	M	F	6,71	1,01	0,30
M5-865 -1	M	F	7,28	0,80	0,33
M5-477 -2	M	F	6,94	0,83	0,31
M5-333 -2	M	F	6,87	0,76	0,29
M5-118 -3	M	F	5,91	0,96	0,21
M4-894 -2	M	F	7,71	1,11	0,65
M5-447 -1	M	F	6,43	0,66	0,24
M5-368 -2	M	F	7,58	0,77	0,38
M5-322 -2	M	F	6,86	0,98	0,28
M5-225 -2	M	F	5,45	0,17	0,17
M5-214 -1	M	F	7,94	0,19	0,44
M5-325 -1	M	F	5,46	1,25	0,18
M5-522 -1	M	F	7,88	0,75	0,46
M5-213 -1	M	F	7,14	0,37	0,30
M4-900 -2	M	F	6,66	0,45	0,26
M5-568 -2	M	F	7,44	0,75	0,36
M5-472 -1	M	F	6,63	0,65	0,24
M5-129 -2	M	F	6,16	0,70	0,23
M4-936 -1	M	F	6,78	0,69	0,28
M5-286 -1	M	F	6,69	0,64	0,27
M5-663 -1	M	F	3,82	0,17	0,05

Sunflower genotype	Type	Origin	DSS		Speed
			Mean	SD	
M5-531 -2	M	F	5,89	0,70	0,20
M5-54 -1	M	F	2,60	0,32	0,05
M5-106 -1	M	F	6,41	0,70	0,23
M5-33 -2	M	F	6,26	0,74	0,23
M5-99 -2	M	F	6,45	1,00	0,26
M5-331 -2	M	F	5,65	0,75	0,19
M4-917 -1	M	F	6,70	0,71	0,21
M5-44 -1	M	F	6,50	1,27	0,26
M5-485 -2	M	F	7,18	0,71	0,33
M5-42 -1	M	F	6,30	0,33	0,20
M5-427 -1	M	F	6,10	1,37	0,23
M5-485 -1	M	F	5,80	0,41	0,18
M5-483 -2	M	F	5,65	0,41	0,16
M5-63 -1	M	F	6,41	0,65	0,25
M4-904 -1 -3	M	F	5,90	0,11	0,17
M4-871 -1	M	F	6,60	0,16	0,22
M4-873 -2	M	F	7,50	0,29	0,35
M4-901 -2	M	F	6,92	0,62	0,30
M5-459-4	M	F	6,53	0,64	0,24
M5-116 -2	M	F	6,36	0,10	0,21
AS613	M	F	7,19	0,58	0,31
M5-16 -2	M	F	7,07	0,22	0,29
M5-36 -2	M	F	7,24	0,48	0,31
M5-46 -1	M	F	6,09	0,30	0,21
M5-66 -1	M	F	7,23	1,10	0,36
M5-78 -1	M	F	5,46	0,58	0,15
M5-85 -2	M	F	7,50	0,36	0,30
M5-133 -1	M	F	6,24	0,51	0,21
M5-133 -2	M	F	6,64	0,63	0,26
M5-135 -2	M	F	7,01	0,67	0,29
M5-143 -2	M	F	6,32	1,22	0,21
M5-147 -2	M	F	6,92	1,13	0,30
M5-186 -1	M	F	6,77	0,50	0,29
M5-263 -2	M	F	5,54	1,06	0,17
M5-284 -1	M	F	7,50	1,15	0,39
M5-284 -2	M	F	6,43	0,43	0,24
M5-375 -1	M	F	6,98	0,61	0,28
M5-386 -1	M	F	6,83	0,23	0,26
M5-417 -1	M	F	6,93	0,22	0,27
M5-509 -1	M	F	5,86	0,96	0,22
M5-575 -1	M	F	6,26	1,12	0,23
M5-582 -2	M	F	6,58	0,40	0,23
M5-609 -2	M	F	7,07	0,44	0,27
M5-652 -1	M	F	5,87	0,37	0,19
M5-653 -1	M	F	7,40	1,28	0,40
M5-691 -1	M	F	6,61	0,86	0,23
M5-756 -2	M	F	6,73	1,11	0,27
M5-765 -1	M	F	6,62	1,04	0,25
M5-771 -1	M	F	6,42	0,83	0,24
M5-785 -1	M	F	6,57	0,41	0,24
M5-791 -1	M	F	5,72	0,66	0,18
M5-792 -2	M	F	6,43	1,05	0,22
M5-795 -2	M	F	6,67	0,72	0,26
M5-796 -1	M	F	6,87	0,81	0,29
M5-796 -2	M	F	4,21	0,73	0,09
M5-835 -2	M	F	6,93	0,35	0,25
M5-842 -2	M	F	6,47	0,66	0,21
M5-844 -1	M	F	6,03	0,72	0,21

Sunflower genotype	Type	Origin	DSS		Speed
			Mean	SD	
M5-853 -1	M	F	6,72	0,64	0,25
M5-862 -2	M	F	6,83	0,24	0,25
M5-32 -2	M	F	6,26	0,72	0,23
M5-54 -1A	M	F	5,86	0,45	0,18
M5-862 -1	M	F	2,61	0,77	0,05
M4-886 -2	M	F	6,34	0,97	0,22
M5-502 -2 -1	M	F	5,72	0,69	0,18
M5-676 -1 -1	M	F	7,12	0,46	0,30
M5-696 -1 -1	M	F	7,54	0,35	0,35
M5-696 -1 -2	M	F	6,24	0,81	0,24
M5-826 -2 -1	M	F	6,19	0,84	0,22
M5-826 -2 -2	M	F	6,15	0,64	0,20
M5-32 -1 -1	M	F	6,43	1,17	0,25
M5-338 -2 -2	M	F	6,86	0,44	0,27
M5-39 -2 -1	M	F	7,13	0,56	0,29
M5-352 -2 -2	M	F	4,67	1,01	0,12
M5-39 -2 -2	M	F	3,03	0,74	0,04
M5-381 -1 -1	M	F	6,62	0,40	0,24
M5-52 -1 -1	M	F	6,05	0,93	0,20
M5-502 -2 -2	M	F	4,39	0,99	0,11
M5-548 -1 -1	M	F	6,88	0,66	0,27
M5-641 -2 -1	M	F	6,88	0,49	0,27
M4-931 -2	M	F	6,00	0,41	0,19
M4-873 -1	M	F	6,78	0,34	0,27
C106	RIL	F	7,72	1,43	0,76
C113	RIL	F	6,46	0,38	0,26
C115	RIL	F	6,28	2,41	0,64
C119	RIL	F	7,00	0,00	0,35
C121	RIL	F	5,56	1,36	0,18
C134	RIL	F	7,19	0,80	0,36
C138	RIL	F	7,29	1,15	0,35
C146	RIL	F	5,04	1,82	0,16
C40	RIL	F	6,70	1,78	0,41
C43	RIL	F	5,90	0,33	0,21
C79	RIL	F	7,19	1,80	0,68
C81	RIL	F	4,33	1,87	0,13
C92	RIL	F	5,67	0,48	0,18
LR11	RIL	F	5,10	2,06	0,18
LR44	RIL	F	5,27	0,64	0,16
LR64	RIL	F	7,76	1,16	0,52
LR67	RIL	F	5,22	1,69	0,19
PAC2	W	F	6,76	0,80	0,30
RHA266	W	USA	6,57	1,23	0,29
1151 North Dakota	W	USA	5,75	0,75	0,14
665 Iowa	W	USA	3,00	0,19	0,07
1012 Nebraska	W	USA	2,56	0,55	0,05
211 Illinois	W	USA	2,23	0,80	0,04
1016 Nebraska	BL	F	3,77	0,62	0,06
510 Kansas	BL	F	4,25	1,08	0,08
AS53	BL	F	6,00	0,85	0,16
AS77	BL	F	5,46	1,24	0,13
AS86-1	BL	F	4,37	0,93	0,10
AS97	BL	F	6,28	2,07	0,21
SDB1	BL	USA	7,96	0,54	0,39
SDB1(cms)	BL	USA	6,72	0,42	0,23
SDB2	BL	USA	5,68	1,53	0,18
SDB2(cms)	BL	USA	5,88	0,43	0,19
SDB3	BL	USA	5,59	0,12	0,17

Sunflower genotype	Type	Origin	DSS		Speed
			Mean	SD	
SDB3(cms)	BL	USA	6,23	1,88	0,25
SDR17	BL	USA	5,63	0,57	0,13
SDR18	BL	USA	3,28	0,78	0,05
SDR19	BL	USA	3,61	1,61	0,07
SDR20	BL	USA	6,55	1,00	0,23
195/2n	BL	EE	8,42	0,51	0,54
27/2n-p	BL	EE	8,67	0,50	0,72
51/5n	BL	EE	8,60	0,52	0,51
22/3n-p	BL	EE	8,67	0,50	0,71
11/4n-p	BL	EE	8,33	0,49	0,52
14/2n-p	BL	EE	8,67	0,49	0,69
38/2n-p	BL	EE	8,60	0,52	0,63
3/2n-p	BL	EE	8,70	0,48	0,45
76/1n	BL	EE	8,82	0,40	0,75
H11	BL	H	8,17	0,41	0,50
H12	BL	H	8,29	0,49	0,57

^a BL, breeder's line; RIL, recombinant inbred line; M, gamma-irradiation induced mutant line and W, wild type.

^b F, France; USA, the United States of America; H, Hungary; EE, Eastern Europe

^c disease severity score of 36 seedlings per genotype challenged by Phoma black stem isolate (MP6), seven days after petiole inoculation. A score of 1 (resistance) to 9 (susceptible) was given in relation to the proportion of petiole area showing necrosis, where: 1 = 0-5%, 2 = 6-10%, 3 = 11-20%, 4 = 21-30%, 5 = 31-40%, 6 = 41-60%, 7 = 61-80%; 8 = 81-99% and 9 = 100%, with necrosis spreading down the stem.

STADES REPÈRES DU TOURNESOL

Un stade est atteint lorsque 50% des plantes sont à ce stade.
Les codes "lettres" ou "chiffres" sont équivalents.

Germination-levée



Stade A1 (1.0)
Apparition des hypocotyles en crosse.



Stade A2 (1.1)
Emergence des cotylédons et premières feuilles visibles.

Phase végétative



Stade B3-B4 (2.3-2.4)
La seconde paire de feuilles opposées apparaît et a environ 4 cm de long; les pétioles sont visibles du dessus.

Phase bouton floral



Stade E1 (3.1)
Apparition du bouton floral étroitement inséré au milieu des jeunes feuilles : STADE BOUTON ETOILE.

Phase bouton floral



Stade E2 (3.2)
Le bouton se détache de la couronne foliaire, les bractées sont nettement distinguables des feuilles. Son diamètre varie de 0,5 à 2 cm.



Stade E4 (3.4)
Le bouton est nettement dégagé des feuilles, son diamètre varie de 5 à 8 cm, il demeure horizontal. Une partie des bractées se déploie.

Floraison



Stade F1 (4.1)
Le bouton floral s'incline; les fleurs ligulées sont perpendiculaires au plateau.



Stade F3.2 (4.3)
Les trois cercles de fleurons les plus externes ont leurs anthères visibles et dégagées et leurs stigmates déployés. Les trois cercles suivants ont leurs anthères visibles et dégagées.

Maturation



Stade M0 (5.0)
Chute des fleurs ligulées. Le dos du capitule est encore vert.



Stade M2 (5.2)
Le dos du capitule est jaune. Les bractées sont aux 3/4 brunes. L'humidité de la graine avoisine 20-25%.



Stade M3 (5.3)
Le dos du capitule est marbré de brun. Les bractées sont brunes. La tige se dessèche. L'humidité de la graine avoisine 15%.



Stade M4 (5.4)
Tous les organes de la plante sont bruns foncés. L'humidité de la graine avoisine 10%.

Annexe 3

Protocole d'extraction d'ADN génomique d'après Dellaporta et al. (1985)

Solutions nécessaires à l'extraction:

1- Tampon d'extraction

Produit	PM (g/mol)	Concentration Finale	Quantité
Tris 1 M, pH 7	121.14 g/mol	0.1 M	10 ml
EDTA 0.5 M, pH 8	372.24 g/mol	50 mM	10 ml
SDS	288.38 g/mol	173 mM	5 g
NaCl	58.44 g/mol	0.25 M	1.45 g
H ₂ O UHQ			qsp 100 ml

A stériliser par autoclavage.

2- Solution de stockage TE (Tris-EDTA)

Produit	PM (g/mol)	Concentration Finale	Quantité
Tris-HCl 1 M, pH 8	121.12	10 mM	100µl
EDTA 0.5 M, pH 8	372.24	1 mM	2µl
H ₂ O UHQ			qsp 10 ml

A stériliser par autoclavage.

Extraction d'ADN génomique d'après Dellaporta et al. (1985)

- Prélever 5 disques foliaires
- Les placer dans un eppendorf de 2 ml contenant 4 billes de verre
- Congeler les eppendorfs dans de l'azote liquide
- Broyer: 2 fois 3 minutes à 30 s-1 par le micro-broyeur Restch
- Ajouter 400 µl de tampon d'extraction et 2.5 µl de RNase 10 µM
- Laisser incuber au bain-marie à 65°C pendant 30 minutes
- Ajouter 200 µl d'Acétate de potassium(5M)
- Tourner-retourner
- Placer dans la glace pendant 10minutes
- Ajouter 500µl de chloroforme isoamylalcool (24:1)
- Tourner-retourner
- Centrifuger pendant 10minutes à 4°C à la vitesse de 10000 rpm
- Prélever le surnageant
- Ajouter le même volume d'isopropanol froid
- Tourner-retourner
- Centrifuger pendant 10minutes à 4°C à la vitesse de 10000 rpm
- Laver le culot avec de l'éthanol 70% par trois fois.
- Sécher dans le speed-vac pendant 15 minutes.
- Ajouter 100 µl de TE.

Protocole d'extraction d'ADN génomique d'après Fulton et al. (1995)

Tampon d'extraction d'ADN génomique (préparation extemporanée)

- 2.5 volumes de tampon d'extraction d'AND

Produit	Quantité
Sorbitol (0.35 M)	6.3777g
Tris-base (0.1 M)	1.2114g
EDTA (5 mM, pH 7.5)	0.1861g
H2O UHQ	qsp 100 ml

- 2.5 volumes de tampon de lyse de noyaux

Produit	Quantité
Tris-base (0.2 M)	2.423g
EDTA (0.05 M)	1.861g
NaCl ₂ (2.0 M)	11.689g
2% CATB	2.000g
H2O UHQ	qsp 100 ml

- 1 volume de Sarkosyl (N Lauylsarcosine) à 5% (p/v)

Ex: pour 50ml: Sarkosyl 2.5g

- 0.5 g de bisulfite de sodium pour 100 ml de mélange

Extraction d'ADN génomique d'après Fulton et al. (1995)

- Prélever sur des jeunes feuilles 6 disques foliaires (1cm de diamètre, soit 70 à 80 mg de poids frais) dans un tube Eppendorf (2 ml) contenant des billes de verre (4 billes à Φ 3mm /tube), et congeler directement dans l'azote liquide
- Broyer au micro broyeur (MM300, Restch) à fréquence 30 S-1 à 2 min
- Ajouter 750 μ l de tampon d'extraction contenant 2.5 μ l de RNase à 10 mg/ml
- Bien vortexer et incuber au bain marie à 65°C pendant 90 min
- Centrifuger 10 min à 15000g à 4°C et prélever le surnageant
- Ajouter 750 μ l de mélange de chloroforme : isoamylalcool (24:1) et vortexer
- Centrifuger 10 min à 15000g à 4°C et prélever la phase aqueuse (surnageant)
- Ajouter 1 volume d'isopropanol froid (environ 700 μ l)
- Mélanger à la main et doucement –L'ADN précipite (ADN)
- Centrifuger 5 min à 15000g à 4°C
- Laver à l'éthanol 70% (500 μ l) et centrifuger 5 min à 15000g à 4 °C
- Sécher 15 min au speed vac
- Ajouter 50 ou 100 μ l de TE (pH = 8.0) à 4 °C pendant un nuit

Annexe 4

Protocole d'AFLP

Pour l'AFLP nous amenons tous les échantillons d'ADN à une valeur de 250 ng dans 18 µl d'eau ultra pure.

1- Digestion d'ADN génomique

Préparation du «mix» de digestion (valeur pour 1 échantillon)

Produit	1 échantillon
Bu-RL (10 X)	2.50 µl
BSA (10 µg/µl)	0.25 µl
MseI (5U/µl)	0.5 µl
EcoRI (10U/µl)	0.25 µl
H ₂ O	3.50 µl

Ajouter 7 µl de ce « mix » à chaque échantillon d'ADN (250ng/18µl), pour un volume final de 25 µl, après avoir homogénéisé en pipetant, nous les laissons incuber 2 heures à 37°C, puis 15 minutes à 70°C pour stopper l'action des endonucléases.

2- Ligation des adaptateurs

Pour cette opération, il faut préparé le « mix » suivant (valeur pour un échantillon):

Produit	1 échantillon
EcoRI adaptateur (5µM)	1.000 µl
MseI adaptateur (50 µl)	1.000 µl
Bu-RL (10X)	2.500 µl
BSA (10 µg/µl)	0.125 µl
ATP (10mM)	1.000 µl
T4 DNA ligase (1U/µl)	1.000 µl
H ₂ O	18.375 µl

Il faut ajouter 25 µl de ce « mix » à chaque échantillon, pour avoir un volume final de 50µl. Après avoir homogénéisé en pipettant, on les laisse incuber 2 heures à 20°C dans un thermocycleur.

Les 50 µl de solution seront divisés en deux parties:

- 40 µl conservés à – 20°C
- 10 µl seront dilués au 10ème dans 90 µl de TE
 - Dont 95 µl seront conservés à – 20°C
 - et 5 µl serviront pour la préamplification

3- Préamplification

On ajoute le « mix » suivant, au 5 µl d'ADN ligaturée diluée:

Produit	1 échantillon
Oligo EcoRI (+1) (10µM)	1.375 µl
Oligo MseI (+1) (10µM)	1.375 µl
10X PCR buffer minus Mg	5.000 µl
d NTP (2.5 mM each)	4.000 µl
<i>Taq</i> polymérase (5U/µl)	0.200 µl
H ₂ O	31.550 µl

On ajoute 45 µl de ce « mix », pour obtenir un volume final de 50 µl.

Ensuite, on applique le programme suivant à l'aide d'un thermocycleur.

20 cycles de PCR: 94°C durant 30 secondes

56°C durant 60 secondes

72°C durant 60 secondes

Nous obtenons ainsi, 50 µl de préamplification concentré dont:

- 47µl seront conservés à – 20°C
- 3µl sont dilués dans 147µl de TE (150µl) servirons à réaliser les amplifications sélectives

4- Marquage des amorces au $\gamma^{33}\text{P}$

Marquage de l'amorce (valeurs données pour 30 amplifications)

Produit	Quantité
5X forward Rxn buffer	1.500µl
T4 Kinase (10U/µl)	0.375µl
Oligo EcoRI (+3) (50ng/µl)	1.500µl
H ₂ O	2.125µl
En salle radiactivité ATP ($\gamma^{33}\text{P}$)	2.000µl

Cette solution est mise à incuber 1 heure à 37°C puis 10 minutes à 75°C pour stopper l'activité de la Kinase. Les amorces sont conservés à –20°C en salle radactivité.

5- Amplification sélective

« Mix » d'amplification sélective (valeur pour un échantillon)

Produit	1 échantillon
H ₂ O	4.80µl
10X PCR buffer mius Mg	1.00µl
MgCl ₂ (50mM)	0.30µl
dNTP (2.5mM)	0.80µl
Oligo MseI (+3) (50ng/µl)	0.30µl
<i>Taq</i> polymérase (5U/µl)	0.05µl
Oligo EcoRI (+3) marqué	0.25µl

On ajoute donc 7.5 µl aux 2.5 µl d'ADN préamplifiée diluée, après avoir homogénéisé à la pipette, les échantillons sont placés au thermocycleur pour les cycles suivants.

1 cycle:

94°C durant 30 secondes (dénaturation)

65°C durant 30 secondes (hybridation)

72°C durant 60 secondes (élongation)

12 cycles identiques en abaissant la température de 0.7°C à chaque cycle

23 cycles:

94°C durant 30 secondes

56°C durant 30 secondes

72°C durant 60 secondes

Ensuite, on conserve les échantillons à –20°C en salle radioactive, avant de réaliser la migration sur gel polyacrylamide.

6- Eletrophorèse sur gel d'acylamide

Une première étape consiste à traiter les plaques de verre entre lesquelles, le gel va être coulé.

Pour cela, nous avons suivit le protocole suivant:

6-1- Nettoyage des plaques

Il faut nettoyer les deux plaques, avec un papier Kimwipe, une fois à l'eau distillée et une fois à l'éthanol à 70 %. Ensuite, pour la plaque interne (solidaire de la cuve supérieure), on applique à l'aide d'un Kimwipe du Repel-Silane ES (Pharmacia) verticalement et horizontalement. Après 5 à 10 minutes de séchage, nous éliminons l'excès de Repel avec un Kimwipe imbibé d'éthanol à 70 % (sans trop appuyer). Ce produit permettra au gel de ne pas coller sur cette plaque lors de démoulage, après migration.

6-2- Montage du moule

On dépose les « spacers » de chaque côté de la plaque externe, ensuite, on pose la plaque interne, on assemble le tout avec deux mainteneurs. Pour couler le gel, on place une base munie d'un joint à fin d'injecter le gel par le bas de la structure.

6-3- Préparation et coulage du gel 6 %

Dans un becher 250 ml, on ajoute 90 ml de solution polyacrylamide 6 % (19 : 1 acrylamide : bisacrylamide, 8 M urée, TBE 1X). On ajoute 360 µl de persulfate d'ammonium 10 %, puis 120 µl de Temed, puis on agite brièvement. On aspire la solution à l'aide d'une seringue munie d'un tuyau (100 ml). Après avoir branché le tuyau à la base, on injecte « sans faire de bulles » la solution entre les deux plaques. La polymérisation dure 20 à 30 minutes, pour obtenir une zone de dépôt régulière et horizontale, nous introduisons un peigne (dents vers le haut) au sommet du gel. Avant la mise sous tension, nous remplissons la cuve supérieure et inférieure de TBE 0.5X (volume de litre). Ensuite, nous procédons à un pré-run à 250 watts (puissance maximale), afin d'obtenir une température de migration idéale de 55°C.

6-4- Préparation des échantillons

On ajoute 10 µl de tampon de charge (98 % formamide, 10 mM EDTA, 0.05 % bleu de bromophénol, 0.05 % xylène cyanol) aux échantillons issus d'amplification. On dénature les échantillons 3 minutes à 95°C, puis on met les échantillons dans la glace.

6-5- Dépôt et migration

Après avoir installer le peigne (dents vers le bas) enfoncer de 0.5 mm, nous nettoyons les puits grâce à une seringue (1 ml) pour chasser l'urée. On dépose 4 µl de chaque échantillon, puis on met sous tension l'appareil à la puissance de 100 à 130 watts (il faut garder la température à 55 °C) pendant 2 heures.

7- Exposition et révélation par autoradiographie

Annexe 5

Préparation de tampons

1-TBE 10X (pour 2 litres)

Produit	Quantité
Tris	208.32g
Acide Borique	110.06g
EDTA	14.90g
H ₂ O UHQ	1000ml

2- TBE 0.5% (pour 2 litres)

Produit	Quantité
TBE 10X	100ml
H ₂ O UHQ	1900ml

3- Acrylamide (6% acrylamide, 8 M urée, TBE 1X)

- Mettre dans une bouteille de 2 litres:
 - 300 ml d'acrylamide 40% (19:1 acrylamide: bis) (Gibco);
 - 200 ml de TBE 10X
- Dissoudre petit à petit 960 g d'urée (quantum) sur l'agitateur chauffant à thermostat 2-3;
- Vider dans une fiole Jaugée et ajuster à 2 L avec de l'eau Ultra Pure;
- Filtrer sur membrane de 0.45 µm (Gelman) avec une pompe à vide.

4- Tampon de charge

Produit	Quantité
Xylene Cyanol	50 mg
Bromophenol Bleu	50 mg
EDTA 0.5M, pH8.0	2 ml
Formamide (98%)	98 ml
H ₂ O UHQ	100 ml

Annexe 6

Extraction d'ARNs totaux

Preparation et stockage des produits:

- Ethanol absolu et éthanol 70%: stock -20°C
- Tris 1M pH8: dans H₂O ultra pure, autoclave
- LiCl 4M: dans H₂O ultra pure, autoclave
- EDTA 0.5M pH8: dans H₂O ultra pure, autoclave
- Acétate de Na 3M pH5.6: dans H₂O ultra pure, autoclave
- SDS 20%: dans H₂O ultra pure- stock température ambiante
- Chloroforme-Isoamylalcool (24:1): stock 4°C
- Phenol: stock 4°C

Preparation de 50 ml tampon d'extraction:

5 ml Tris 1M pH8 + 1.25 ml LiCl 4M + 2.5 ml SDS 20% + 1ml EDTA 0.5M pH8 + 40.25ml H₂O DEPC

Protocole d'extraction pour 1 gr de pétioles

- Broyage des échantillons (micro broyeur) conserver la congélation
- Bain-marie 70 °C 20minutes: 2 ml Tp d'extraction + 2 ml phénol
- Ajouter le mélange à la poudre congelée, vortexer doucement 1 minute
- Ajouter 2 ml de chloroforme-isoamylalcool (24:1), vortexer
- Centri 10 min 10000 g 4°C, récupérer les surnageant dans des tubes
- Ajouter un volume égal de LiCl 4 M, vortexer 10 secondes et laisser à 4°C over night
- Partager chaque tube dans 5 ependorfs (2ml)
- Centri 30 minute 20000g 4°C
- Enlever le surnageant, ajouter 250 µl d'H₂O DEPC, 25 µl d'acétate de Na 3M pH 5.6 et 500 µl d'éthanol absolu. Pipeter doucement.
- 1 heure minimum à -80°C
- Centri 30 minute 20000g 4°C
- Enlever le surnageant, laver avec 500 µl d'éthanol 70%, pipeter doucement (2 fois)
- Centri 4 minute 20000g 4°C
- Vider l'éthanol, puis centrifugation rapide avec la petite centrifugeuse 30 secondes pour collecter l'éthanol au fond de l'ependorf.
- Suspendre le culot dans 20µl d'H₂O DEPC 20%
- Conservation à -80°C

Traitement DNase

- Préparer dans un Eppendorf de 200 µl
 - x µl de solution d'ARN
 - 1 µl de DNase (1 unité) pour entre 5 et 10 µg d'ARN
 - 10 µl de réaction buffer Promega 10 X
 - H₂O DEPC qsp 100µl
- Incuber 30 min à 37°C (thermocycleur)
- Ajouter 10 µl de solution stop Promega
- Incuber 10 min à 65°C

Elimination de la DNase

- Transférer la solution dans un Eppendorf de 1.5 ml
- Compléter avec H₂O DEPC qsp 300 µl
- Ajouter 300 µl de Phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25:24:1) et mélanger
- Centrifuger 10 min à 10 000 g, à 4°C
- Récupérer la phase aqueuse
- Compléter avec H₂O DEPC qsp 300 µl
- Ajouter 300 µl de chloroforme et mélanger
- Centrifuger 10 min à 10 000 g, à 4°C
- Estimer le volume obtenu
- Ajouter 1/10ème de volume de Na Acétate 3M, pH 5.2 et 2 volumes d'EtOH absolu
- Incuber 2 heures minimum à -80°C
- Centrifuger 30 min à 12 000 g, à 4°C
- Eliminer le surnageant et laver le culot avec 500 µl d'EtOH 70°
- Centrifuger 15 min à 12 000 g, à 4°C
- Eliminer le surnageant et sécher le culot sur de la glace sous une hotte aspirante
- Reprendre le culot dans 30 µl d'H₂O DEPC

Dosage et contrôle

- Doser au spectrophotomètre en diluant 1 µl de solution d'ARN dans 400 µl d'H₂O DEPC

$$D.O.260 \text{ nm} \times 40 \times 400 = \text{Qté d'ARN en ng/}\mu\text{l}$$

- Eléctrophorèse contrôle: gel 1.2% d'agarose dans TAE
 - 1 µg d'ARN maxi
 - 2 µl de tampon de charge 6X
 - H₂O DEPC qsp 12 µl
- Diluer la solution d'ARN de façon à obtenir 3 µg d'ARN par 12.5 µl d'H₂O DEPC, soit une concentration de 0.24 µg/µl.
- Aliquoter par 12.5 µl dans des Eppendorf de 200µl (Eppendorfs PCR)
- Stocker à -80°C

Synthèse d'ADNc pour Q-PCR

Préparation du kit

Sortir le kit du congélateur et décongeler les tubes en les plaçant sur de la glace. Après décongélation, vortexer brièvement chaque tube, puis centrifuger rapidement.

Si plusieurs échantillons d'ARN doivent être traités, préparer un mix RT :

Produit	1 échantillon
Réaction buffer 5X	8 µl
Mix dNTP	4 µl
Recombinant RNase inhibitor	1 µl
MMLV reverse transcriptase	2 µl
dTT	4 µl
Volume total	19 µl

Mélanger par pipetage.

Synthèse

- 10 µg/ µl d'ARN
- Ajouter 4 µl d'oligos dT (volume final 24 µl)
- Chauffer le mélange à 70°C pendant 10 min (thermocycleur)
- Remplacer rapidement sur glace
- Ajouter 15 µl du mix RT (volume final : 39 µl) – mélanger par pipetage
- Incuber à 42°C pendant 1 heure puis
- Ajouter 1 µL de MMLV
- Incuber à 42°C pendant à nouveau 1 heure puis à 70°C pendant 15 min (thermocycleur)